

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT IM GEBIET DES  
PATENTWESENS (1979) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
4. September 2003 (04.09.2003)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 03/072118 A1**

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: **A61K 35/70**,  
35/74, 35/80, 9/16, 9/51

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE03/00747

(22) Internationales Anmeldedatum:  
28. Februar 2003 (28.02.2003)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
102 08 949.3 28. Februar 2002 (28.02.2002) DE  
102 08 364.9 24. August 2002 (24.08.2002) DE

(71) Anmelder und

(72) Erfinder: **LUKOWSKI, Gerold** [DE/DE]; Birnenweg  
35, 17489 Greifswald (DE). **JUELICH, Wolf-Dieter**  
[DE/DE]; Wollweberstrasse 9, 17489 Greifswald (DE).  
**LINDEQUIST, Ulrike** [DE/DE]; Lise-Meitner-Strasse  
6a, 17491 Greifswald (DE). **MUNDT, Sabine** [DE/DE];  
Sandornweg 29, 18439 Stralsund (DE).

(74) Anwalt: **WEHLAN, Martin**; Paul-Gesche-Strasse 1,  
10315 Berlin (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT,  
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,  
CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE,  
GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR,  
KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK,  
MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU,  
SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG,  
US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH,  
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),  
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,  
TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE,  
DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL,  
PT, SE, SI, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI,  
CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Veröffentlicht:**

- mit internationalem Recherchenbericht
- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden  
Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen  
eintreffen

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen  
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on  
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe  
der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: MICRO/NANOPARTICLE OBTAINED FROM LIPID-CONTAINING MARINE ORGANISMS FOR USE IN PHAR-  
MACEUTICS AND COSMETICS

(54) Bezeichnung: MIKRO-/NANOPARTIKEL AUS LIPIDHALTIGEN MARINEN ORGANISMEN FÜR PHARMAZIE UND  
KOSMETIK

(57) Abstract: The invention relates to pharmaceutically or cosmetically active agents, which are obtained by converting biomasses  
consisting of lipid-containing marine organisms into microparticles and nanoparticles and which preferably have an average diameter  
of 10 nm 10 µm. Possible fields of application of these agents include the field of medicine, the production of cosmetics or the  
production of foodstuffs and, in particular, the agents are used for the prophylaxis of nosocomial infections, accelerating cell growth  
and for inhibiting staphylococci.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft pharmazeutisch oder kosmetisch wirksame Mittel, die durch Umwandlung von Bi-  
omassen lipidhaltiger mariner Organismen in Mikro- und Nanopartikel gewonnen wurden und vorzugsweise einen mittleren Durch-  
messer von 10 nm -10 µm besitzen. Mögliche Anwendungsgebiete sind die Medizin, die Herstellung von Kosmetika oder die  
Nahrungsmittelherstellung, insbesondere Prophylaxe nosokomialer Infektionen, Beschleunigung des Zellwachstums und Hemmung  
von Staphylokokken.

WO 03/072118 A1

10/527695

DT09 Rec'd PCT/PTO 11 MAR 2005

**Beschreibung**

[0001] Die Erfindung betrifft pharmazeutisch oder kosmetisch wirksame Mittel, die durch Umwandlung von Biomassen lipidhaltiger mariner Organismen in Mikro- und Nanopartikel gewonnen wurden und vorzugsweise einen mittleren Durchmesser von 10 nm bis 10 µm besitzen. Mögliche Anwendungsgebiete sind die Medizin, die Herstellung von Kosmetika oder die Nahrungsmittelherstellung.

[0002] Marine Lebewesen, insbesondere Mikro- und Makroalgen, marine Pilze (Thraustochytriden) und marine Bakterien, zeichnen sich durch einen hohen Gehalt an Lipiden und eine spezifische Lipidzusammensetzung aus (Lindequist, U. and Th. Schweder: Marine Biotechnology, in: Biotechnology. 2. ed., Ed. H.-J. Rehm Wiley-VCH Weinheim 2001, pp. 442-473).

[0003] So können z.B. Mikroalgen unter wachstumslimitierten Bedingungen, besonders unter N-Limitierung, bis zu 70 % des assimilierten Kohlenstoffs als energetisch effiziente Lipide speichern. Gehalt und Zusammensetzung der Lipide können durch die Wachstumsbedingungen beeinflusst werden. Während höhere Pflanzen vorwiegend Lipide mit relativ kurzkettigen Fettsäuren (C12-C18) und einer geringen Anzahl von Doppelbindungen (bis C18:3) produzieren, ist die Variabilität der von marinen Organismen gebildeten Fettsäuren ungleich höher. Algen synthetisieren zahlreiche mehrfach ungesättigte C16-C22-Fettsäuren, z.B. Linolsäure (C18:2), Linolensäure (C18:3), Arachidonsäure (C20:4), Eicosapentaensäure (EPA, C20:5) und Docosahexaensäure (DHA, C22:6) (Pohl, P. und F. Zurheide: Fatty acids and lipids of marine algae and the control of their biosynthesis by environmental factors. In: Marine Algae in Pharmaceutical Science. Ed. H.A. Hoppe, T. Levring, Y. Tanaka, Walter de Gruyter New York, 1979, pp. 473-523; Roessler, P.G.: Environmental control of glycerolipid metabolism in microalgae: commercial implications and future research directions. J. Phycology 26, 393-399, 1990; Puls, O.: Biotechnology with cyanobacteria and microalgae, in: Biotechnology, 2. ed., Ed. H.-J. Rehm Wiley-VCH Weinheim 2001, pp. 105-136, Servel, M.O., C. Claire, A. Derrien, L. Ciffard, Y. De Roeck-Holtzhauer: Fatty acid composition of some marine microalgae. Phytochemistry 36, 691-693, 1994). Die heterotrophe Mikroalge *Cryptocodinium cohnii* kann bis zu 13 % ihrer Zellmasse als Lipide mit 36-43% DHA bilden (DeSwaaf, M.E., DeRijk, T.C., Eggink, G., Sijsma, L.: Optimisation of docosahexaenoic acid production in batch cultivations by *Cryptocodinium cohnii*. J. Biotech. 70, 185 – 192, 1999).

[0004] Thraustochytriden sind pilzliche Protisten, die bis zu 50 % ihrer Lipide als DHA produzieren und im Cytoplasma in Form von Öltropfen ablagern (Lewis, T.E., Nichols, P.D., McMeekin, T.A.: The biotechnological potential of thraustochytrids, Mar. Biotechnol. 1, 580 – 587 1999).

[0005] Marine Bakterien inkorporieren im Gegensatz dazu die polyungesättigten Fettsäuren in Membranphospholipide. Der Gehalt an EPA in den Gesamtlipiden von *Colwellia psychrethra* liegt bei 6-7 % (Bowman, J.P., Gosink, J.J., McCammon, S.A., Lewis, T.T., Nichols, D.S., Skerratt, J.H., Rea, S.M., McMeekin, T.A.: *Colwellia demingae* sp. nov., *Colwellia hornerae* sp. nov., *Colwellia rossensis* sp. nov. and *Colwellia psychrotropica* sp. nov.: psychrophilic Antarctic species with the ability to synthesise docosahexaenoic acid (22:6 n-3), Int. J. Syst. Bacteriol. 48, 1171 – 1180, 1997).

[0006] Linol- (Z,Z-9,12-Octadecadiensäure) und Linolensäure (Z,Z,Z-9,12,15-Octadecatriensäure) sind als essentielle Fettsäuren für die menschliche Ernährung unersetzlich. Arachidonsäure (5,8,11,14-Eicosatetraensäure) ist Vorstufe der physiologisch wichtigen Eicosanoide. EPA und DHA (Omega-3-Fettsäuren) sind nicht nur für die frühkindliche Gehirnentwicklung notwendig, sondern besitzen auch prophylaktischen/therapeutischen Nutzen bei Herz-Kreislauf-Krankheiten, rheumatischen Erkrankungen, chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen, Neurodermitis, Psoriasis und Allergien. Es wurde z.B. nachgewiesen, dass das Sterberisiko von Patienten nach einem bereits erlittenen Herzinfarkt durch tägliche Einnahme von Omega-3-Fettsäuren signifikant erniedrigt wird (GISSI-Studie). Von besonderem Interesse sind strukturell ungewöhnliche Fettsäuren, die über weitere biologische Eigenschaften verfügen. Die Hydroxyfettsäuren Coriolsäure (13-HODE Z,E) und Dimorphecalsäure (9-HODE E,Z), die aus einer *Oscillatoria*-Art isoliert wurden, zeichnen sich ebenso wie Linolensäure durch antibakterielle Aktivität aus (Kreitlow, S.: Dissertation Greifswald 2000).

[0007] Zusätzlich zu den Fettsäuren sind die marinen Organismen auch durch ihren Reichtum an Proteinen, Vitaminen und Mineralstoffen für Ernährung, Kosmetik und Medizin von Interesse [Lindequist, U. and Th. Schweder: Marine Biotechnology, in: Biotechnology. 2. ed., Ed. H.-J. Rehm Wiley-VCH Weinheim 2001, pp. 442-473; Puls, O.: Biotechnology with cyanobacteria and microalgae, in: Biotechnology, 2. ed., Ed. H.-J. Rehm Wiley-VCH Weinheim 2001, pp. 105-136, Becker, Microalgae: Biotechnology and Microbiology, Cambridge, 1994; Köhler, Kurth, Pulz, *Spirulina platensis*-an microalgal additive for cosmetics, Biotechnology for Microalgae, 1997).

[0008] Die Herstellung und Anwendung von Extrakten aus Algen und die Anwendung von Algenbiomasse in den Bereichen Ernährung, Kosmetik und Medizin ist aus der Patentliteratur

bekannt (z. B. US 4,320,050 A, IL 59766, DE 100 59 107 A1). Auch wurden spezielle Kombinationen von Fibrillin mit Blaualgenextrakten in der Kosmetik und Medizin beschrieben (WO 01/07006 A1). Weitere Patente beziehen sich auf die Produktion von polyungesättigten Fettsäuren durch marine Organismen (z.B. Barclay, W.R. (1992) Process for the heterotrophic production of microbial oils with high concentrations of omega-3 highly unsaturated fatty acids, U.S. Patent 5,130,242 A; Barclay, W.R. (1994) Process for growing Thraustochytrium and Schizochytrium using non-chloride salts to produce a micro-floral biomass having omega-3 highly unsaturated fatty acids, U.S. Patent 5,340,742 A).

**[0009]** Die Verwendung der lipidhaltigen Biomasse von marinen Organismen als Wirkstoffträger wurde bisher nicht beschrieben.

**[0010]** Bei der Herstellung von Nano- und Mikropartikeln sind verschiedene Herstellungsverfahren auf Basis von Lipiden oder Polymeren bereits bekannt. So wurden bereits Verfahren zur Herstellung von Lipid-Mikropartikeln auf Basis von Phospholipiden beschrieben, die antimykotische Eigenschaften haben und im pharmazeutischen oder kosmetischen Bereich eingesetzt werden können (DE 69 00 2905 T2). Andere Verfahren beschreiben Lipidnanopartikel auf Basis von extrahierten Mono-, Di und Triglyceriden, Ölen oder Wachsen. Mit Hilfe dieser gewonnenen Lipide werden ebenfalls pharmazeutische Wirkstoffe verkapselt (WO 94/20072 A1). Weitere Lipidnanopartikel beschreiben Substanzen ebenfalls auf Basis von Lipiden zur parenteralen Anwendung (WO 98/56362 A1). Auch werden spezielle Techniken zur Herstellung von Lipidnanopartikeln vorgestellt (z. B. EP 0 526 666 A). Bisher sind in der Literatur jedoch keine lipidhaltigen Mikro- und Nanopartikel auf Basis mariner Organismen (Mikro- und Makroalgen, Thraustochytriden, marine Bakterien) und deren Herstellung beschrieben worden.

**[0011]** Staphylococcus aureus ist ein häufiger Kommensale. Etwa 30% der Bevölkerung sind dauerhaft symptomfrei mit S. aureus besiedelt. Die häufige symptomfreie Besiedlung führt zu einer oft unbemerkten Weiterverbreitung.

**[0012]** Andererseits ist S. aureus auch ein häufiger Erreger schwerer Infektionen und von Sepsis, vor allem bei abwehrgeschwächten Patienten.

**[0013]** Besorgniserregend ist die rasche Entwicklung multiresistenter S. aureus Stämme (MRSA). Auf Grund der Multiresistenz sind Infektionen mit MRSA therapeutisch schwer beherrschbar.

**[0014]** Die Verbreitung der MRSA-Stämme ist bisher jedoch weitgehend auf die Krankenhäuser beschränkt ist. Deshalb besteht unabhängig von der Ersterkrankung bei Aufnahme in

ein Krankenhaus eine große Gefahr. Etwa 10 % der aufgenommenen Patienten erkranken an nosokomialen Infektionen. Es wird mit 600 000 bis 800 000 Infektionen mit multiresistenten Erregern gerechnet, die im Krankenhaus erworben werden (Hyg. Med. 26 (2001)183). Staphylokokken sind die wichtigsten Erreger, bei denen mit einem völligen Versagen der antibiotischen Therapie gerechnet wird. Eine Hautpflege, die der Besiedlung mit multiresistenten Keimen entgegenwirkt, kann bei der Aufnahme in ein Krankenhaus die Gefahr einer nosokomialen Infektion vermindern. Wenn nur ein Teil dieser Infektionen verhindert werden kann, wäre dies ein großer Erfolg.

[0015] Zur Dekolonisation beim Auftreten von MRSA werden bisher bakterizid wirkende Substanzen eingesetzt. Dadurch wird auch die Standortflora abgetötet. Damit wird bei einer Neubesiedlung der Haut die Ansiedlung von MRSA sogar erleichtert.

[0016] Kürzlich wurde bekannt, dass antimikrobielle Peptide die Haut vor einer invasiven bakteriellen Infektion schützen (V.Nizet, T. Ohtake, X. Lauth, J. Trowbridge, J. Rusdill, R.A. Dorschner, V. Pestonjamas, J. Piraino, K. Huttner, R.L. Gallo: Innate antimicrobial peptide protects the skin from invasive bacterial infection. Nature 414, 454-457 (2001). Diese Peptide haben werden auf der Oberfläche von Epithelzellen und in Neutrophilen gebildet und bewirken eine sehr frühe Abwehr eingedrungener Erreger. Sie bewirken zelluläre Effekte, die sich deutlich von der antibakteriellen Aktivität in vitro unterscheiden. Der kritische erste Schritt einer Kausalkette, die letztendlich zu einer Infektion führt, ist die Bindung von Adhäsionen des Erregers an geeignete Rezeptoren auf der Hautoberfläche. Die Adhäsion wird in vielen Fällen eingeleitet durch Bindung von auf der Oberfläche des Erregers ausgebildeten Proteinen an Kohlenhydrat-Rezeptoren des Wirts, daneben spielen auch Protein-Protein-Wechselwirkungen und Bindung von Polysacchariden des Erregers an Rezeptoren auf der Haut eine Rolle (Relman D, Tuomanen E, Falkow S et al., Cell 1990; 61: 1375-1382; Kanbe T., Cutler JE. Infect Immun 1994; 62: 1662-1668).

[0017] Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es daher, neue Wirkstoffe und Wirkstoffträger mit gegenüber dem Stand der Technik verbesserten Eigenschaften für verschiedene Zwecke bereitzustellen.

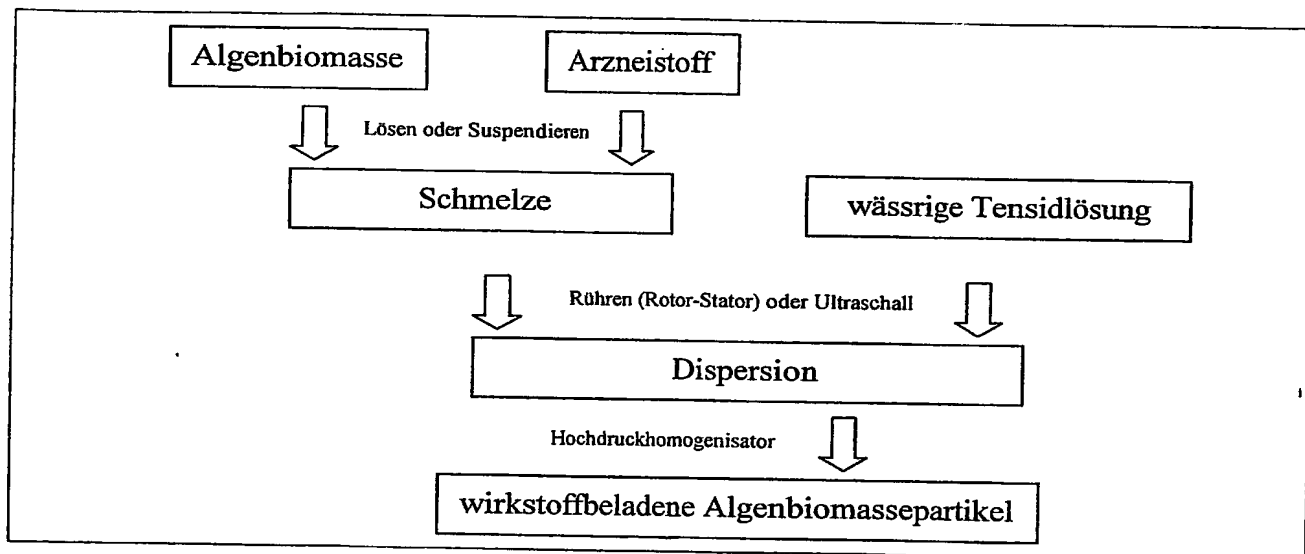
[0018] Die Aufgabe wurde durch pharmazeutisch oder kosmetisch wirksame Mittel aus marinen Organismen (Mikro- und Makroalgen, Thraustochytriden, marine Bakterien), die durch Unwandlung der Biomassen dieser Organismen in Mikro- und Nanopartikel erhalten wurden, gelöst. Erfindungsgemäß wurden Biomassen aus marinen Organismen (Mikro- und Makroalgen, Thraustochytriden, marine Bakterien) auf kostengünstigem direktem Weg zu den neuarti-

gen Substanzen mit speziellen Wirkungen umgesetzt. Überraschenderweise hat sich herausgestellt, dass es gelungen ist, die gesundheitsfördernden Inhaltsstoffe der lipidhaltigen marinen Organismen besonders effizient zu nutzen und verschiedene Anwendungen zu ermöglichen, die mit den nativen Biomassen nicht erreicht werden können.

[0019] Das erfindungsgemäße Verfahren führt zu neuen, wertvollen Produkten, die auf bekannten Wegen nicht erreicht werden können und enthält drei Alternativen:

### 1. Homogenisationsverfahren

Schema 1: Herstellungsprozess von wirkstoffbeladenen Algebiomassepartikeln (Homogenisationsprinzip)



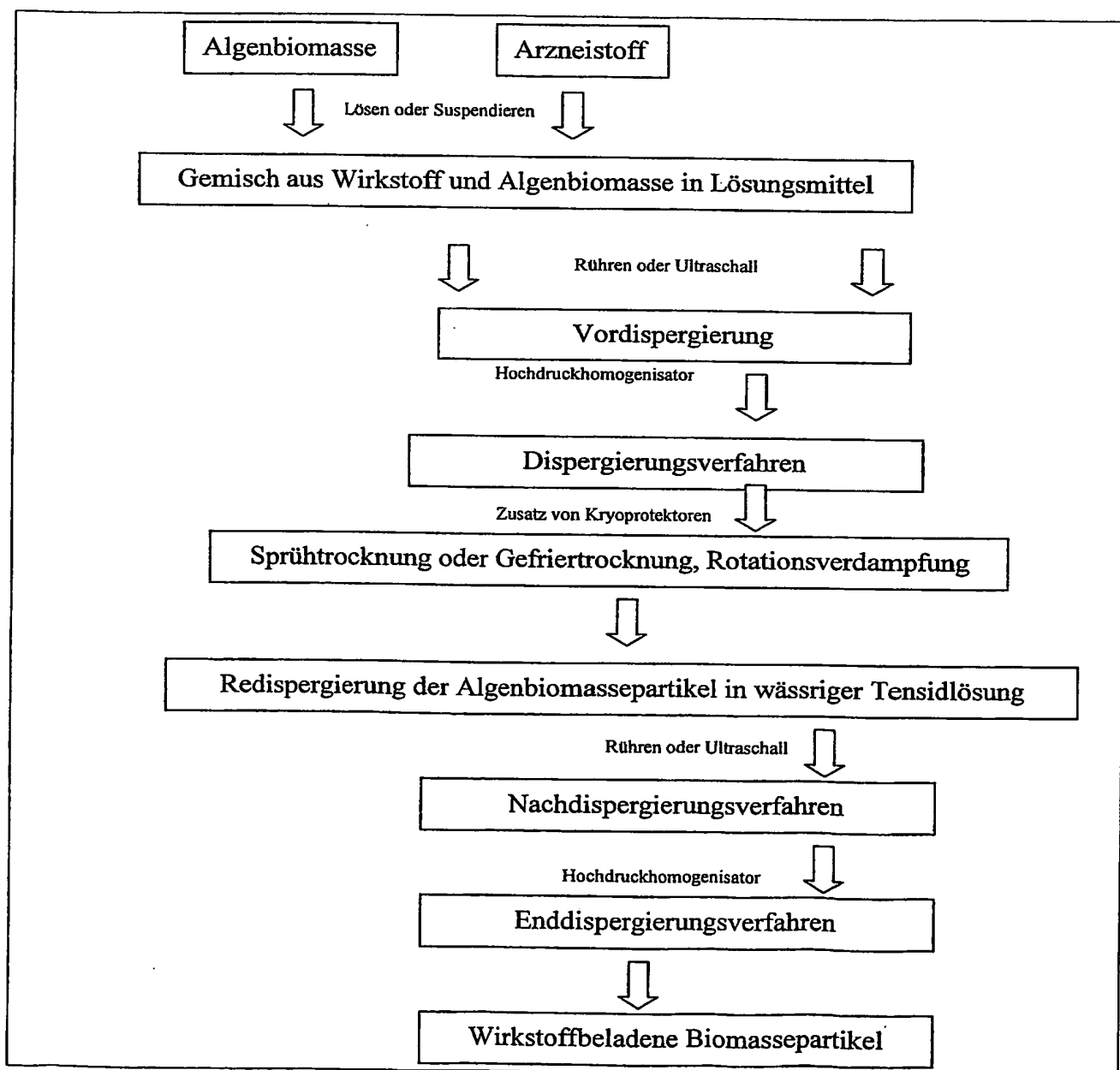
[0020] Die lipidhaltigen marinen Mikroorganismen werden zunächst erwärmt, so dass eine Verflüssigung der darin enthaltenen Fettsäuren erreicht wird. In diese Biomasse werden ein oder mehrere Wirkstoffe (fest oder flüssig) hinzugegeben (Schema 1). Der Wirkstoff wird in den Fettsäuren der Cyanobakterien bzw. der gesamten lipidhaltigen marinen Mikroorganismen suspendiert, dispergiert bzw. adsorbiert. Parallel dazu wird ein Tensid-Wasser-Gemisch hergestellt. Dieses Tensid-Wasser-Gemisch wird auf eine Temperatur oberhalb der Schmelztemperatur der Fettsäuren erwärmt. Die beiden Phasen werden bei der gewählten Temperatur vereint. Anschließend wird mit Hilfe eines Rührers (Rotor-Stator-Prinzip) oder mit Hilfe von Ultraschall eine Vorsuspension hergestellt. Die Vorsuspension wird danach mit Hilfe eines Hochdruckhomogenisators homogenisiert, wobei die Zahl der Homogenisationszyklen und der Arbeitsdruck nach der erwünschten Partikelgröße und Stabilität der Zubereitung gewählt

werden. Zwischen den einzelnen Zyklen ist darauf zu achten, dass die Herstellungstemperatur immer wieder eingestellt wird. Das Tensid dient zur Stabilisierung der Suspension.

[0021] Sollte es bei der Herstellung Probleme mit der Höhe der Temperatur (z. B. empfindliche Wirkstoffe) geben, so besteht die Möglichkeit, das gesamte Verfahren auch bei Raumtemperatur durchzuführen. In diesem Falle wird das Verfahren in gleicher Weise, wie zuvor beschrieben, durchgeführt, wobei der Wirkstoff an den lipidhaltigen marinen Mikroorganismen adsorbiert oder bei Zusatz einer geringen Wassermenge dispergiert wird.

## 2. Lösungsmittel-Homogenisations-Verfahren

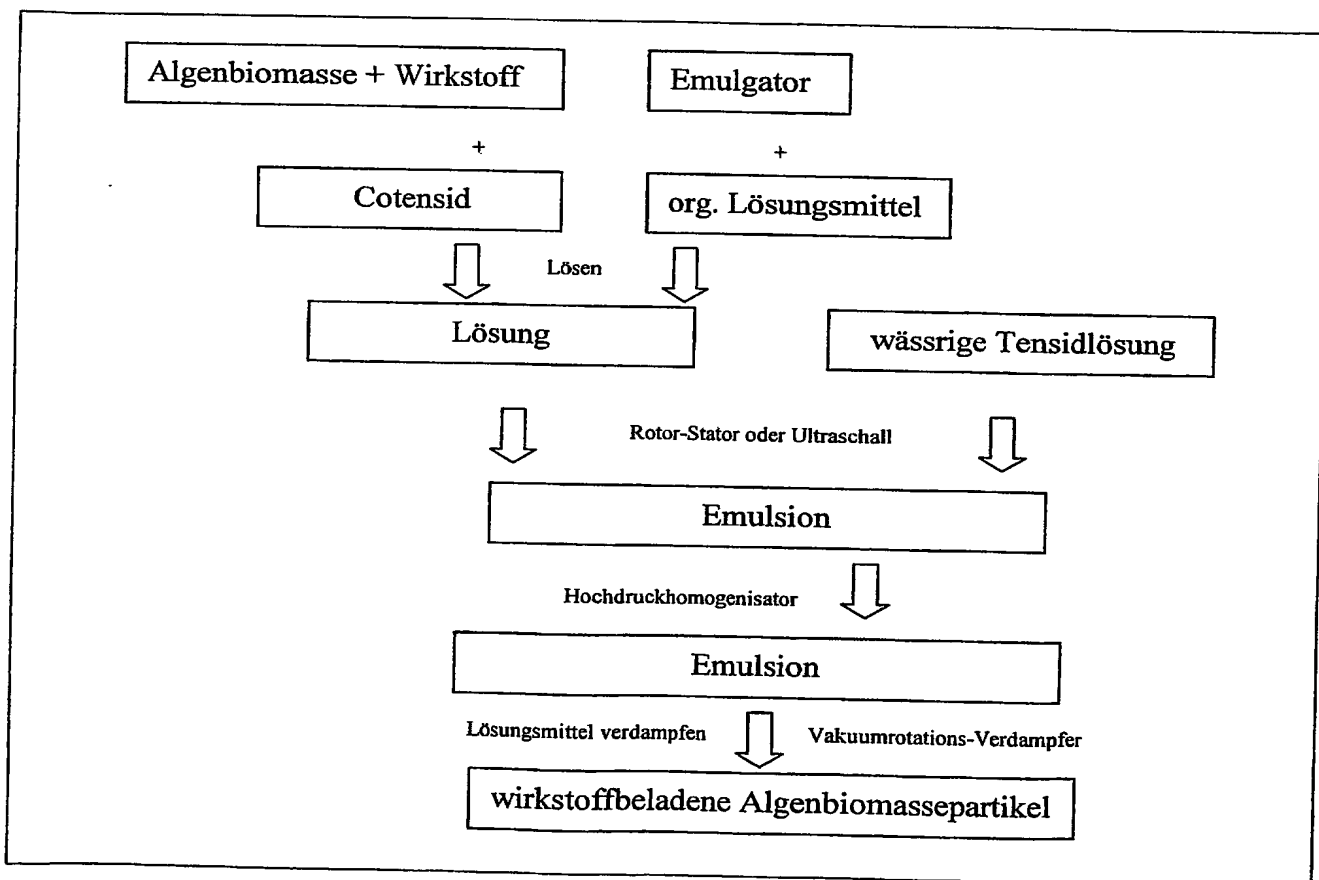
Schema 2: Herstellungsprozess von Biomassenpartikeln (Lösungsmittel-Homogenisations-Verfahren)



[0022] Die lipidhaltigen marinen Mikroorganismen und der Wirkstoff werden in einem verdampfbaren organischen Lösungsmittel suspendiert. Danach wird dieses Gemisch vordispersiert (Stator-Rotor-Prinzip oder Ultraschall), homogenisiert (Hochdruckhomogenisator) und anschließend sprühgetrocknet oder gefriergetrocknet (Schema 2). Beim Gefrier Trocknen ist zu beachten, dass geeignete Kryoprotektoren eingesetzt werden. Es besteht darüber hinaus auch die Möglichkeit, das organische Lösungsmittel durch geeignete Verdampfer (z. B. Rotationsverdampfer) zu entfernen. Anschließend können die Partikel aus lipidhaltigen marinen Mikroorganismen in geeigneten wässrigen Tensid-Lösungen redispersiert werden. Danach ist eine erneute Dispergierung (Stator-Rotor-Prinzip oder Ultraschall) und Homogenisierung (Hochdruckhomogenisator) notwendig.

### 3. Lösungsmittel-Emulsions-Verfahren

Schema 3: Herstellungsprozess nach dem Lösungsmittel-Emulsions-Verfahren



[0023] Dieses Verfahren basiert auf der Bereitung einer Emulsion aus Wasser und einer Lösung der Algenbiomasse-Wirkstoff in einem geeigneten organischen Lösungsmittel (Schema 3). Dazu wird ein Emulgator zur Dispergierung des Algenbiomasse-Wirkstoffes eingesetzt.



Emulgator und Algenbiomasse werden in einem geeigneten organischen Lösungsmittel gelöst. Zu dieser Lösung wird eine wässrige Phase, die ein wasserlösliches Cotensid enthält, hinzugefügt. Danach wird dieses Gemisch vordispersiert (Stator-Rotor-Prinzip oder Ultraschall). Nach einem Homogenisationsschritt mit Hilfe eines Hochdruckhomogenisators wird das organische Lösungsmittel durch Verdampfen entfernt, wobei die Wirkstoff enthaltende Biomasse in Form von festen Partikeln ausfällt.

[0024] Die Anwendung dieser Verfahren führt zu neuartigen marinen Biomasse- Wirkstoff - Partikeln mit einem mittleren Durchmesser, der je nach Herstellungsart zwischen 10 nm und 10 µm liegt.

[0025] Die erfindungsgemäßen Mittel sind auch ohne die Zugabe von einem zusätzlichen Wirkstoff wirksam, weil durch das erfindungsgemäße Verfahren die Bestandteile der lipidhaltigen marinen Organismen besser verfügbar gemacht werden.

[0026] So war bereits überraschend, dass durch das erfindungsgemäße Verfahren nicht bakterizid wirkende natürliche Substanzen, die Inhaltsstoffe von marinen Organismen sind, z.B. Norlichhexanthon, nun in vitro das Wachstum von MRSA hemmen.

[0027] Außerdem war überraschend, dass nicht bakterizid wirkende natürliche Wirkstoffe wie die in der Natur weit verbreiteten Ubichinonderivate oder hydroxylierte Aromaten, wie sie in verschiedenen marinen Pilzarten gefunden werden, durch das erfindungsgemäße Verfahren ebenfalls in vitro das Wachstum von MRSA hemmen. Ein Einsatz dieser an sich bekannten Stoffe zur Bekämpfung von MRSA wurde bisher nicht beschrieben. Außerdem ist bekannt, dass die genannten Naturstoffe auf der Haut Staphylokokken nicht in ausreichendem Maße abtöten. Durch das erfindungsgemäße Verfahren wurde somit ein synergistischer Effekt erreicht.

[0028] Bei Übertragungsversuchen von mit MRSA kontaminierter Haut (Donator) auf keimarme Haut (Akzeptor) hat sich überraschenderweise gezeigt, dass eine Übertragung von MRSA weitgehend vermieden werden kann, wenn die Haut vor der Übertragung mit einem synergistisch wirkenden Kombination von Lipiden (als Bestandteile von marinen Organismen), Immunstimulantien, Radikalfängern und Xanthonen der allgemeinen Formel gepflegt wurde. Offensichtlich werden durch diese synergistische Kombination bereits sehr frühe Stufen der Kausalkette von der Übertragung der pathogenen Mikroorganismen bis zur Infektion gestört, so dass bereits die Ausbildung einer Kolonisation verhindert werden kann.

[0029] Spezielle Eigenschaften werden erreicht, wenn in den nach Anspruch 1 hergestellten Mikro- und Nanopartikel Aggregate aus den lipidhaltigen marinen Organismen und Tonmineralien (Phytosilikate) enthalten sind. Spezielle Charakteristika dieser Mikro- und Nanopartikel sind ihre große Oberfläche, ihr hohes Ionenaustauschvermögen, ihre große Quellfähigkeit und ihre Fähigkeit, in die Schichten der Silikatstruktur die unterschiedlichsten Wirkstoffe einzulagern. Überraschenderweise wurde gefunden, dass die auf diese Weise hergestellten Aggregate das Zellwachstum deutlich begünstigen.

[0030] Vorteilhaft ist insbesondere die Verwendung von Tonen, die in ihrer Kristallstruktur dem Bentonit entsprechen. Bentonit weist nicht nur einen sehr hohen Anteil von Partikeln mit einer Größe  $< 2 \mu\text{m}$  auf, sondern besitzt auch eine hohe Ionenaustausch Kapazität von 0,76 meq/g, eine extrem große spezifische Oberfläche von  $562 \text{ m}^2/\text{g}$  und den stärksten Einfluss auf das Wachstum von Amnion-Epithelzellen.

[0031] Eine besonders vorteilhafte Ausführungsform der Erfindung ist die Verwendung von lipidhaltigen marinen Organismen, die z.B. in Gegenwart von Tonmineralien kultiviert wurden. Aufgrund der großen spezifischen Oberfläche sind auf dieser Basis hergestellte Mikro- und Nanopartikel als Wirkstoffträger hervorragend geeignet, zumal die Wirkstoffabgabe durch den Anteil und die Zusammensetzung der mineralischen Komponente sehr gut gesteuert werden kann.

[0032] Die vorgestellten Prinzipien sind geeignet, verschiedene pflegende Komponenten und/oder Mineralstoffe und/oder Radikalfänger und/oder Vitamine und/oder Nahrungsergänzungsstoffe in Biomassen zu einzulagern. Auf diese Weise ist es möglich, in der Kosmetik die wertvollen Inhaltsstoffe der Algen wie Proteine, Mineralien und Vitaminen, mehrfach ungesättigte Fettsäuren wie  $\gamma$ -Linolensäure, Arachidonsäure, Eicosapentaensäure und Docosahexaensäure in besonders günstiger Form zu nutzen.

[0033] Gegenstand der Erfindung ist somit auch eine Zusammensetzung aus Biomassen mariner Organismen und Mineralstoffen und/oder Radikalfängern und/oder Nahrungsergänzungsstoffen und/oder Vitaminen, insbesondere Vitamin C.

[0034] Zusätzlich können erfindungsgemäß ein oder mehrere pharmazeutische oder kosmetische Wirkstoffe in die Mikro- und Nanopartikel inkorporiert werden.

[0035] Als vorteilhaft hat sich der Zusatz von Xanthon (z.B. Norlichhexanthon) oder deren Derivaten und/oder Ubichinonen der Kettenlänge  $n = 1$  bis  $n = 15$  und/oder anorganischen Thiocyanaten und/oder Hydrothiocyanaten organischer Basen und/oder Trihydroxybenzaldehyd oder dessen Derivaten erwiesen.

[0036] Erfindungsgemäß können Biomassen mariner Organismen in Kombination mit Thio-  
cyanaten und/oder Hydrothiocyanaten organischer Basen und/oder Trihydroxybenzaldehyd  
oder dessen Derivaten auch ohne die Umwandlung in Mikro- und Nanopartikel eingesetzt und  
als kosmetische bzw. pharmazeutische Mittel verwendet werden oder aber zur Herstellung  
5 pharmazeutischer und kosmetischer Mittel dienen.

[0037] Die erfindungsgemäße Herstellung hat den Vorteil, dass die Freisetzung der inkorpo-  
rierten Substanzen durch Wahl der Temperatur, der Wirkstoffe, des Tonmineralanteils und der  
Tenside gesteuert werden kann. Erfindungsgemäß ist es vorteilhaft, die Teilchen in destillier-  
10 tem Wasser oder in einem wässrigen Medium mit Zusätzen wie Elektrolyten, Polyonen, Mo-  
no-, Di- und Polysacchariden, Isotonisierungsmitteln, Puffersubstanzen, Gefrierschutzmitteln  
und Konservierungsmittel zu dispergieren. Um den erfindungsgemäßen Zweck zu erreichen,  
kann ein Zusatz von einem oder mehreren dispersionsstabilisierenden Substanzen notwendig  
sein. Eine vorteilhafte Ausführungsform ist dadurch gekennzeichnet, dass der Biomasse ein  
15 oder mehrere Wirkstoffe, Vitamine oder Nahrungsergänzungsstoffe in fester und/ oder flüssiger  
Form zugesetzt werden. Zweckmäßig ist es, die zugesetzten Wirkstoffe in den Fettsäuren der  
Biomasse zu suspendieren, zu dispergieren oder zu adsorbieren. Erfindungsgemäß wird die  
Biomasse in einem weiteren Herstellungsschritt mit einem Tensid- Wasser-Gemisch vereinigt.  
Zweckmäßig ist es, zunächst mit Hilfe eines Rührers (Rotor-Stator-Prinzip) oder mit Hilfe  
20 von Ultraschall eine Vorsuspension herzustellen. Erfindungsgemäß wird diese Vorsuspension  
danach mit Hilfe eines Hochdruckhomogenisators homogenisiert, wobei die Zahl der Homo-  
genisationszyklen und der Arbeitsdruck nach der dem erfinderischen Zweck entsprechenden  
Partikelgröße und Stabilität der Zubereitung gewählt werden.

[0038] Bei einem anderen, ebenfalls erfindungsgemäßen Herstellungsverfahren werden Bio-  
25 masse und Wirkstoffe in einem verdampfbaren organischen Lösungsmittel suspendiert. Da-  
nach wird dieses Gemisch vordispersiert (Stator-Rotor-Prinzip oder Ultraschall) und homo-  
genisiert (Hochdruckhomogenisator). Anschließend wird das Lösungsmittel durch Sprühtrock-  
nung oder Gefriertrocknung oder mittels Rotationsverdampfer entfernt. Falls erforderlich,  
kann die Biomasse in geeigneten wässrigen Tensid-Lösungen redispergiert und danach nach-  
30 dispersiert (Stator-Rotor-Prinzip oder Ultraschall) und anschließend homogenisiert  
(Hochdruckhomogenisator) werden. Falls erforderlich, kann ein Coemulgator bzw. ein Emul-  
gator zur Dispergierung des Biomasse-Wirkstoffes-Mischung eingesetzt werden.

[0039] Die nach den beschriebenen Verfahren hergestellten Mikro und Nanopartikel ermögli-  
35 chen eine Verwendung auf den verschiedensten Gebieten. Überraschenderweise zeigte sich  
eine deutlich bessere Bioverfügbarkeit der neuartigen Substanzen gegenüber den reinen Stof-

fen. Das ermöglicht die Verwendung der Partikel als pflegende Komponenten in kosmetischen Produkten allein oder in Kombination mit anderen Pflegeprodukten. Die neuen Substanzen können problemlos in andere Pflegekomplexgrundlagen eingearbeitet werden. Die erfindungsgemäßen Formulierungen machen die Haut besonders geschmeidig und pflegen sie. Wie Fett-  
emulsionen zeigen die Partikeln nur eine geringe systemische Toxizität und kaum Zytotoxizität.

[0040] Völlig überraschend wurde gefunden, dass Extrakte der Biomasse antibakterielle Effekte zeigen und in vitro sogar das Wachstum der multiresistenten Staphylokokken deutlich reduzierten. Nach Umwandlung in Mikro- und Nanopartikel unterstützen die Inhaltstoffe der marinen Organismen die natürliche Abwehrbarriere der Haut. Die Bindung einer pathogenen Mikrobe an einen Rezeptor des Wirtes ist der kritische frühe Schritt in einer Entwicklung zu einer Kolonisation bzw. Infektion. Bereits dieser frühe Schritt kann überraschenderweise durch die erfindungsgemäßen Formulierungen beeinflusst werden.

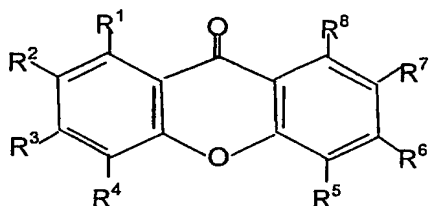
[0041] Die vorliegende Erfindung ermöglicht erstmals die Verwendung lipidhaltiger mariner Organismen als Wirkstoffträger, z.B. für Antibiotika.

[0042] Die Erfindung erlaubt die Verwendung von Biomassen lipidhaltiger mariner Organismen in Form von Mikro- und Nanopartikeln als pharmazeutisch oder kosmetisch wirksame Mittel sowie als Nahrungsmittelzusätze. Die Verwendung der lipidhaltigen marinen Organismen in Form von Mikro- und Nanopartikeln zur Herstellung von Kosmetika oder Arzneimitteln oder Nahrungsmitteln, auch von diätischen Erzeugnissen ist möglich. Eine Kombination mit anderen Kosmetika oder Arzneimitteln ist ebenfalls praktikabel.

[0043] Die Erfindung kann die Verhinderung der Bindung von nosokomial bedeutsamen Anflugkeimen an Rezeptoren auf der Haut oder Geweben und/oder zur Verhinderung ihres Wachstums auf der Haut oder Geweben verwendet werden. Als besonders wirksam hat sich eine Kombination von Biomassen mariner Organismen mit Vitaminen, insbesondere mit Vitamin C erwiesen.

[0044] Die erfindungsgemäße Verwendung schließt auch die Prophylaxe nosokomialer Infektionen ein und eignet sich besonders zur Hemmung von Staphylokokken, insbesondere MRSA (multiresistenter Staphylococcus aureus Stämme), zur Sanierung von mit MRSA kontaminierter Haut.

[0045] Ein besonders wirksames Hautpflegemittel wurde dadurch erhalten, dass als Wirkstoffe Xanthonderivate der Formel

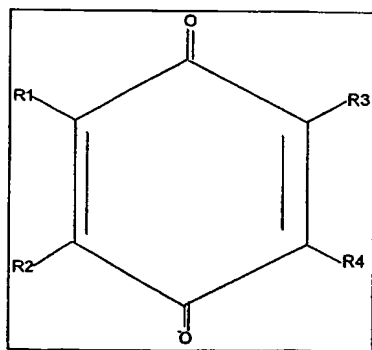


zugegeben werden, wobei R1-R8 in Tabelle 1 aufgeführten Substituenten sein können.

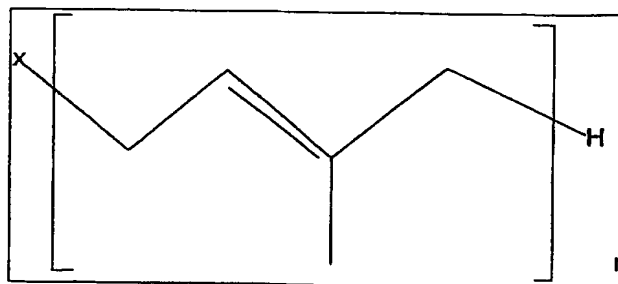
Tabelle 1:

H, OH, OMe, OAc			
Me, Ac, CH <sub>2</sub> OH, CHO, CF <sub>3</sub> , COOH, COOMe, CN, CONH <sub>2</sub>			
Cl, F, NO <sub>2</sub> , NH <sub>2</sub> , NHAc, NMe <sub>2</sub>			

[0046] Als Radikalfänger können zusätzlich Tocopherole und /oder Benzochinone der allgemeinen Formel 2 mit der Kettenlänge n= 1 bis n = 15 enthalten sein, mit den Resten R1-R3, wobei R1, R2 und R3 Wasserstoff, Halogen, Alkyl- oder Alkoxygruppe, R4 als isoprenoide Seitenkette mit 1 bis 10 isoprenoiden Einheiten X oder als aliphatische Seitenkette mit 1 bis 10 CH<sub>3</sub>- Gruppen (Formel 3).

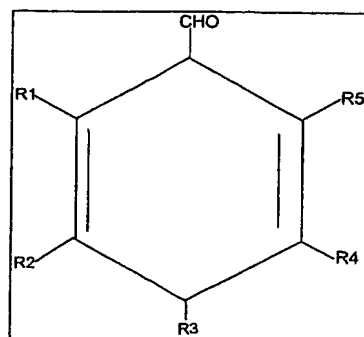


Formel 2



Formel 3

[0047] Die erfindungsgemäßen Mittel können Dihydroxybenzaldehyd oder dessen Derivate des mit der allgemeinen Formel 4 enthalten, mit den Resten R1, R2, R3, R4 und R5 als Wasserstoff, Halogen, Alkyl –oder Alkangruppen.



Formel 4

[0048] Zahlreiche lipidhaltige marine Organismen enthalten Substanzen, die als unspezifische Immunstimulantien wirken können, d. h. sie stimulieren Leukozyten und wirken als Aktivatoren des retikuloendothelialen Systems. Nach der erfindungsgemäßen Umwandlung der Biomasse dieser Organismen in Mikro- oder Nanopartikel ermöglichen diese Inhaltstoffe weitere Anwendungen. Vorteilhaft ist beispielsweise ein Einsatz in Abdeckmaterialien zur Wundversorgung. Erfindungsgemäß mit Antibiotika dotierte Mikro- und Nanopartikel erlauben eine gesteuerte Freisetzung der antimikrobiellen Wirkstoffe und eine gleichzeitige Immunstimulation. Vorteilhafterweise können diese Mikro- und Nanopartikel zusätzlich mit anorganischen Thiocyanaten oder Hydrothiocyanaten organischer Basen dotiert werden.

[0049] Erfindungsgemäß können die Mikro- und Nanopartikel auch zusätzlich DNA enthalten und gestatten somit ihre Verwendung für einen Gentransfer.

[0050] Neben der Anwendung in kosmetischen Produkten sind auch Anwendungen im diätischen und lebensmitteltechnologischen Bereich erfindungsgemäß. Der große Reichtum lipophiler mariner Organismen an wertvollen Inhaltsstoffen ermöglicht nach erfindungsgemäßer Umwandlung zu Mikro- und Nanopartikel eine gezielte Substituierung von Mangelzuständen. Fette, Vitamine, Mineralstoffe und andere wertvolle Inhaltsstoffe der marinen Organismen können nach Umwandlung in Mikro- und Nanopartikel durch den Säugetierorganismus besser genutzt werden. Eine Anreicherung mit Nahrungsergänzungstoffen ist bei Anwendung der erfindungsgemäßen Verfahren problemlos möglich. Folgende Gruppen mariner Organismen verfügen über Inhaltsstoffe, die nur in diesen in geeigneter Zusammensetzung und Konzentration vorkommen und die über die erfindungsgemäße Umwandlung in Mikro- und Nanopartikel einer Nutzung zugeführt werden können:

- \*Cyanobakterien der Klasse Oscillatoriales, insbesondere die Stämme SPH 03, SPH 04, SPH 05, SPH 06, SPH 09, SPH 10, SPH 11, SPH 12, SPH 13, SPH 14, SPH 20, SPH 21, SPH 22, SPH 23, SPH 25, SPH 26, SPH 29, SPH 32, SPH 34, SPH 37.

- \*Cyanobakterien der Klasse Nostocales, insbesondere die Stämme SPH 18, SPH 20, SPH 27, SPH 28, SPH 38
- \*Cyanobakterien der Klasse Chroococcales unter besonderer Berücksichtigung der Stämme SPH 07a, SPH 07b, SPH 08, SPH 14, SPH 16, SPH 17, SPH 24, SPH 33, SPH 36, SPH 39, SPH 40, SPH 43 und der Klasse Stigonematales
- \*Makroalgen der Gattungen Asparagopsis, Cystoseira, Codium, Dictyota, Dictyopteris, Enteromorpha, Fucus, Gelidium, Gracilaria, Gracilariopsis, Halopteris, Hypoglossum, Laurencia, Plocamium, Polyneura, Sargassum, Solieria, Ulva
- \*Thraustochytriden der Gattungen Schizochytrium und Thraustochytrium
- \*marine Bakterien der Gattungen Photobacterium, Shewanella und Colwellia.

[0051] Besonders vorteilhaft ist, dass die Partikel mittels Rührwerken (Rotor-Stator-Prinzip) und Hochdruckhomogenisation hergestellt werden können, die seit Jahrzehnten zur Herstellung von Fettemulsionen zur parenteralen Ernährung genutzt und daher für eine Produktion von Biomassepartikeln in industriellem Maßstab zur Verfügung stehen. Sie sind von den staatlichen Behörden zur Herstellung von Parenteralia akzeptiert und bedürfen daher keiner neuen aufwendigen Zulassungsverfahren.

[0052] Die erfindungsgemäße Umwandlung von Biomassen aus lipidhaltigen marinen Organismen ermöglicht darüber hinaus weitere Anwendungen. Die Lipide binden an Kunststoffoberflächen. Das ermöglicht den Einsatz der erfindungsgemäß dotierten Mikro- und Nanopartikel lipidhaltiger mariner Organismen in Slow-release-Systemen zur Prävention implantatassoziierten Infektionen, vorzugsweise von katheter-assoziierten Infektionen. Die feste Biomatrix ermöglicht den Schutz des inkorporierten Wirkstoffs vor chemischer Zersetzung und eine verzögerte Freigabe des Pharmakons. Durch Wahl geeigneter Tenside und Wirkstoffe ist aber auch eine beschleunigte Freisetzung der Wirkstoffe von der Partikeloberfläche möglich, wenn diese an der Oberfläche gelagert werden, so dass eine gesteuerte Wirkstofffreigabeerfindungsgemäß ist. Das erfindungsgemäße Verfahren ermöglicht die Sterilisation von mit den erfindungsgemäßen Mikro- und Nanopartikeln dotierten Materialien.

[0053] Im Gegensatz zu Polymernanopartikeln sind die neuartigen Partikeln aus mariner Biomasse biologisch abbaubar.

[0054] Die Merkmale der Erfindung gehen aus den Elementen der Ansprüche und aus der Beschreibung hervor, wobei sowohl einzelne Merkmale als auch mehrere in Form von Kom-

binationen vorteilhafte Ausführungen darstellen, für die mit dieser Schrift Schutz beantragt wird.

[0055] Das Wesen der Erfindung besteht aus einer Kombination aus bekannten (Biomassen aus lipidhaltigen marinen Organismen) und neuen Elementen (der Umwandlung der Biomassen in Mikro- bzw. Nanopartikel), die sich gegenseitig beeinflussen und in ihrer neuen Gesamtwirkung einen Gebrauchsvorteil und den erstrebten Erfolg ergeben, der darin liegt, dass erstmals Wirkstoffträger auf der Basis von lipidhaltigen marinen Mikroorganismen bereitgestellt werden konnten, dass Inhaltsstoffe dieser Organismen bioverfügbar wurden, dass Stoffe, die bislang nicht pharmazeutisch wirksam waren nun neue Eigenschaften haben und dass die Freisetzung der inkorporierten Substanzen durch Wahl der Temperatur, der Wirkstoffe, des Tonmineralanteils und der Tenside gesteuert werden kann.

[0056] Die Erfindung soll anhand von Ausführungsbeispielen erläutert werden, ohne auf diese Beispiele beschränkt zu sein.

### Ausführungsbeispiele

#### **Beispiel 1 : Herstellung von Mikro- und Nanopartikeln aus Biomasse von Cyanobakterien der Ordnung Chroococcales.**

Es wurden Cyanobakterien des Stammes B 30 eingesetzt, der als Eigenisolation aus dem Jasmunder Bodden (Ostsee) gewonnen wurde. Extrakte unterschiedlicher Polarität aus diesem Stamm zeigten in Screening-Test keine antimikrobielle Wirksamkeit.

Tabelle 2: Rezeptur der Biomasse B 30- Vitamin C – Mikro- und Nanopartikeln

Stoff	Menge in g
Biomasse	5,00
Emulgator (Plantacare 2000)	0,05
Demineralisiertes Wasser	45,00
Homogenisationszyklen	4

[0057] Die Biomasse wird auf eine Temperatur von 50°C erwärmt. Davon getrennt wird eine wässrige Emulgatorlösung auf die entsprechende Temperatur (50°C) erwärmt. Danach werden beide Phasen bei der gewünschten Homogenisierungstemperatur vereint. Dann wird das Gemisch mit Hilfe eines Ultra Turrax T25 der Fa. Janke und Kunkel GmbH & Co KG (Staufen,



Deutschland) in einem Emulgierungsprozess bei 8000 Umdrehungen pro Minute und einer Dauer von 30 Sekunden verarbeitet. Die Suspension wird danach mit einem Kolbenspalt-Hochdruckhomogenisator Micron Lab 40 (APV-Gaulin, Lübeck) bei einem Druck von 500 bar und einer Temperatur von 50°C vier mal homogenisiert.

**Beispiel 2: Herstellung von Mikro- und Nanopartikeln mit Vitamin C aus Biomasse von Cyanobakterien der Ordnung Chroococcales.**

Es wurden Cyanobakterien des Stammes B 30 eingesetzt, der als Eigenisolation aus dem Jas-munder Bodden(Ostsee) gewonnen wurde. Extrakte unterschiedlicher Polarität aus diesem Stamm zeigten in Screening-Test keine antimikrobielle Wirksamkeit.

Tabelle 3: Rezeptur der Biomasse B 30- Vitamin C – Mikro- und Nanopartikeln

Stoff	Menge in g
Biomasse	5,00
Emulgator (Plantacare 2000)	0,05
Demineralisiertes Wasser	45,00
Vitamin C	5
Homogenisationszyklen	4

[0058] Anschließend wurden in die Biomasse 5 g Vitamin C eingearbeitet. Davon getrennt wird eine wässrige Emulgatorlösung auf die entsprechende Temperatur (50°C) erwärmt. Danach werden beide Phasen bei der gewünschten Homogenisierungstemperatur vereint. Das Gemisch wird mit Hilfe eines Ultra Turrax T25 der Fa. Janke und Kunkel GmbH & Co KG (Staufen, Deutschland) in einem Emulgierungsprozess bei 8000 Umdrehungen pro Minute und einer Dauer von 30 Sekunden verarbeitet. Die Suspension wird danach mit einem Kolbenspalt-Hochdruckhomogenisator Micron Lab 40 (APV-Gaulin, Lübeck) bei einem Druck von 500 bar und einer Temperatur von 50°C vier mal homogenisiert.

[0059] Die beiden Mikro- und Nanopartikeln B30 und Vitamin C wurden miteinander gemischt.

**Beispiel 3: Herstellung von Mikro- und Nanopartikeln aus Biomasse von Cyanobakterien der Gattung Spirulina.**

Es wurden Cyanobakterien der kommerziell verfügbaren Gattung Spirulina eingesetzt.

Tabelle 4: Rezeptur der Spirulina – Mikro-und Nanopartikeln

Stoff	Menge in g
Biomasse	5,00
Emulgator (Plantacare 2000)	0,05
Demineralisiertes Wasser	45,00
Homogenisationszyklen	4

[0060] Die Biomasse wird bei einer Temperatur von 25°C in eine wässrige Emulgatorlösung dispergiert. Anschließend wird das Gemisch mit Hilfe eines Ultra Turrax T25 der Fa. Janke und Kunkel GmbH & Co KG (Staufen, Deutschland) in einem Emulgierungsprozess bei 8000 Umdrehungen pro Minute und einer Dauer von 30 Sekunden verarbeitet. Die Suspension wird danach mit einem Kolbenspalt - Hochdruckhomogenisator Micron Lab 40 (APV-Gaulin, Lübeck) bei einem Druck von 500 bar und einer Temperatur von 50°C vier mal homogenisiert.

**Beispiel 4: Herstellung von Mikro-und Nanopartikeln aus Biomasse von Cyanobakterien der Gattung Oscillatoria**

[0061] Es wurden Cyanobakterien die Art Oscillatoria redekei HUB 051 eingesetzt.

Tabelle 5: Rezeptur der Oscillatoria redekei HUB 051 – Partikel

Stoff	Menge in g
Biomasse	5,00
Emulgator (Plantacare 2000)	0,05
Demineralisiertes Wasser	45,00
Homogenisationszyklen	4

[0062] Die Biomasse wird bei einer Temperatur von 25°C in eine wässrige Emulgatorlösung dispergiert. Anschließend wird das Gemisch mit Hilfe eines Ultra Turrax T25 der Fa. Janke und Kunkel GmbH & Co KG (Staufen, Deutschland) in einem Emulgierungsprozess bei 8000 Umdrehungen pro Minute und einer Dauer von 30 Sekunden verarbeitet. Die Suspension wird danach mit einem Kolbenspalt-Hochdruckhomogenisator Micron Lab 40 (APV-Gaulin, Lübeck) bei einem Druck von 500 bar und einer Temperatur von 50°C vier mal homogenisiert.

**Beispiel 5: Herstellung von Mikro-und Nanopartikeln aus Biomasse von Cyanobakterien der Ordnung Nostocales**

[0063] Es wurden Cyanobakterien der Ordnung Nostocales eingesetzt.

Tabelle 6 : Rezeptur der Nostocales – Mikro- und Nanopartikeln

Stoff	Menge in g
Biomasse	5,00
Emulgator (Plantacare 2000)	0,05
Demineralisiertes Wasser	45,00
Homogenisationszyklen	4

- 5 [0064] Die Biomasse wird bei einer Temperatur von 25°C in eine wässrige Emulgatorlösung dispergiert. Anschließend wird das Gemisch mit Hilfe eines Ultra Turrax T25 der Fa. Janke und Kunkel GmbH & Co KG (Staufen, Deutschland) in einem Emulgierungsprozess bei 8000 Umdrehungen pro Minute und einer Dauer von 30 Sekunden verarbeitet. Die Suspension wird  
 10 danach mit einem Kolbenspalt-Hochdruckhomogenisator Micron Lab 40 (APV-Gaulin, Lübeck) bei einem Druck von 500 bar und einer Temperatur von 50°C vier mal homogenisiert.

**Beispiel 6: Herstellung von Mikro- und Nanopartikeln aus Biomasse von Cyanobakterien der Ordnung Chroococcales mit Vitamin C nach dem Lösungsmittelverfahren**

- 15 [0065] Als Biomasse wurde der im Beispiel 1 beschriebene Stamm B 30 eingesetzt.

Tabelle 7: (Lösungsmittelverfahren)

Wasser	45,00 g gereinigtes, filtriertes Wasser
organisches Lösungsmittel	25 ml n-Hexan
Biomasse	0,5 g Chroococcales-Cyanobakterien
Vitamin	5 g Vitamin C
Tensid	0,5 g Plantacare

- 20 [0066] Zunächst wird die Biomasse in n-Hexan gelöst, wobei die Lipide aus der Biomasse gelöst werden. Die Biomasse wird ca. 3 Stunden in dem Lösungsmittel gerührt. Anschließend wird das Lösungsmittel mittels eines Rotationsverdampfer abgezogen. Dabei bildet sich eine Lipidschicht an der Kolbenoberfläche. Zur Redispersierung wird eine Vitamin C- haltige Lösung benötigt: Vitamin C wird in eine Plantacare-Lösung gebacht und nach einem 90 sekun-  
 25 digen Dispergiervorgang 4 mal homogenisiert. Die entstehende Vitamin C-haltige Lösung wird in den Kolben mit der Lipidschicht gebracht. Die Lipidschicht löst sich bei der anschlie-

henden Rotation des Kolbens und bildet dadurch verkapselte Mikro- und Nanopartikeln. Die Rotation dauert zirka 10 Stunden bei einer Temperatur von 40 ° C.

**Beispiel 7: Herstellung von Mikro- und Nanopartikeln aus Biomasse -Norlichexanthon**

Tabelle 8: Rezeptur der Biomasse- Norlichexanthon– Mikro- und Nanopartikeln

Stoff	Menge in g
Wirkstoff (Norlichexanthon)	0,05
Biomasse (Cyanobakterien- Spirulina)	5,00
Emulgator (Plantacare 2000)	0,05
Demineralisiertes Wasser	45,00
Homogenisationszyklen	4

[0067] Die Biomasse wird auf eine Temperatur von 50°C erwärmt und anschließend der verwendete marine Wirkstoff Norlichexanthon darin dispergiert bzw. gelöst. Davon getrennt wird eine wässrige Emulgatorlösung auf die entsprechende Temperatur (50°C) erwärmt. Danach werden beide Phasen bei der gewünschten Homogenisierungstemperatur vereint. Anschließend wird das Gemisch mit Hilfe eines Ultra Turrax T25 der Fa. Janke und Kunkel GmbH & Co KG (Staufen, Deutschland) in einem Emulgierungsprozess bei 8000 Umdrehungen pro Minute und einer Dauer von 30 Sekunden verarbeitet. Die Suspension wird danach mit einem Kolbenspalt-Hochdruckhomogenisator Micron Lab 40 (APV-Gaulin, Lübeck) bei einem Druck von 500 bar und einer Temperatur von 50°C vier mal homogenisiert.

**Beispiel 8: Herstellung Mikro- und Nanopartikeln aus Biomasse - Vitamin E**

Tabelle 9: Rezeptur der Biomasse- Vitamin E– Mikro- und Nanopartikeln

Stoff	Menge in g
Wirkstoff Vitamin E	0,05
Biomasse (Cyanobakterien Spirulina)	5,00
Emulgator (Plantacare 2000)	0,05
Demineralisiertes Wasser	45,00
Homogenisationszyklen	4

[0068] In die Biomasse wird das Vitamin E dispergiert. Davon getrennt wird eine wässrige Emulgatorlösung hergestellt. Anschließend wird das Gemisch mit Hilfe eines Ultra Turrax

T25 der Fa. Janke und Kunkel GmbH & Co KG (Staufen, Deutschland) in einem Emulgierungsprozess bei 8000 Umdrehungen pro Minute und einer Dauer von 30 Sekunden verarbeitet. Die Suspension wird danach mit einem Kolbenspalt-Hochdruckhomogenisator Micron Lab 40 (APV-Gaulin, Lübeck) bei einem Druck von 500 bar und einer Temperatur von 50°C vier mal homogenisiert.

**Beispiel 9: Herstellung Mikro- und Nanopartikeln aus Biomasse - Provitamin Q10**

Tabelle 10 Rezeptur der Biomasse-Provitamin Q10– Mikro- und Nanopartikeln

Stoff	Menge in g
Wirkstoff Provitamin Q10	0,05
Biomasse (Cyanobakterien –Spirulina)	5,00
Emulgator (Plantacare 2000)	0,05
Demineralisiertes Wasser	45,00
Homogenisationszyklen	4

[0069] In die Biomasse wird das Provitamin Q10 dispergiert. Davon getrennt wird eine wässrige Emulgatorlösung hergestellt. Anschließend wird das Gemisch mit Hilfe eines Ultra Turax T25 der Fa. Janke und Kunkel GmbH & Co KG (Staufen, Deutschland) in einem Emulgierungsprozess bei 8000 Umdrehungen pro Minute und einer Dauer von 30 Sekunden verarbeitet. Die Suspension wird danach mit einem Kolbenspalt-Hochdruckhomogenisator Micron Lab 40 (APV-Gaulin, Lübeck) bei einem Druck von 500 bar und einer Temperatur von 50°C vier mal homogenisiert.

**Beispiel 10: Testung von Mikro- und Nanopartikeln „Biomasse B30/Vitamin C“ hergestellt nach Beispiel 1 und 2 am Tiermodell (Kuhеuterzitze).**

[0070] Die beiden Substanzen wurden 1:1 miteinander gemischt.

Methodik:

[0071] Eine Stunde nach Tötung der Kuh wurden die Euterzitzen verarbeitet. Die Zitzen wurden von der Fettschicht befreit. Danach wurden die Zitzen auf Metallstäbe entsprechender Größe gesteckt und mit Schellen befestigt. Die Zitzen wurden mit 70%igem Alkohol abgerieben. 20 µl Testsubstanz wurde aufpipettiert und mit einem Glasspatel verrieben, und bei Raumtemperatur 30-45 Minuten getrocknet. Die Kontamination erfolgte mit 10 µl des Norddeutschen Stammes, MF 0,5 1:10 verdünnt. Nach Bebrütung bei 30°C für 1,5 Stunden wurden die Hautareale auf Müller-Hinton Platten ausgestrichen und bei 37°C inkubiert.

**Auswertung:**

[0072] Bei den Kontrollen wurden ausschließlich Keimzahlen  $> 100$  gefunden. Daraus wurden die mittlere Keimzahl  $n$  und die Streuung berechnet.

- 5 [0073] Bei der Untersuchung der Zubereitungen wurden Keimzahlen zwischen 0 und 100 gefunden. Daraus wurde die mittlere Keimzahl  $m$  auf der Basis der Poisson-Verteilung nach folgender Formel berechnet:  $m = \ln (\text{Zahl der Proben ohne Keimnachweis}/\text{Gesamtzahl der Proben})$ .

10 **Statistische Auswertung:**

[0074] Die Anzahl der Hautareale mit und ohne Keimnachweis für die Kontrolle ohne Behandlung und nach Behandlung mit dem Testprodukt wurde mit Hilfe des Chi-Quadrat-Testes auf Signifikanz geprüft.

**Ergebnisse**

- 15 [0075] Die Testung der Mikro- und Nanopartikeln, herstellt nach Beispiel 1) bewirkte am Hautmodell (Kuheuterzitze) eine ausgeprägte Reduktion der übertragen Kontamination mit MRSA. Die Zahl der Wiederholungen am Kuheuterzitze betrug für die unbehandelten Kontrollen 163. Bei allen 163 Proben war *S. aureus* nachweisbar. Die mittlere Keimzahl betrug 759. Auch bei allen Proben, die mit Wollwachsalkoholsalbe behandelt waren, wurde *S. aureus* nachgewiesen. Nach Anwendung des Testprodukten waren 11 Hautareale mit Keimnachweis und 11 ohne Keimnachweis. Daraus errechnet sich eine im Mittel zu erwartende Keimzahl von 0,7 (Figur 1). Die Keimzahlreduktion ist hoch signifikant.
- 20

25 **Beispiel 11 Testung von Mikro- und Nanopartikeln „Biomasse B30/Vitamin C“ hergestellt nach Beispiel 1 und 2 am Tiermodell Mäuseohr**

**Methodik**

- [0076] Als Testmodell wurden Mäuseohren verwendet. Die Donator-Tiere als Infektionsquelle blieben unbehandelt. Akzeptortiere wurde 3 Tage einmal täglich mit „Biomasse B30/Vitamin C“ hergestellt nach Beispiel 1 behandelt. Dazu wurden 10  $\mu\text{l}$  Testsubstanz wurde aufpipettiert und mit einem Glasspatel verrieben, und bei Raumtemperatur getrocknet. Die Tiere wurden nach vier Tagen getötet. Die Kontamination der Donatortiere erfolgte mit 5  $\mu\text{l}$  des Norddeutschen Stammes, MF 0,5 1:10 verdünnt. Dazu wurde ein unbehandeltes Ohr kontaminiert und danach 90 Minuten bei 30 °C bebrütet. Die mit Biomasse behandelten Ohren wurden auf entsprechende Stempel aufgezogen. Mit Druck wurden die kontaminierten Ohren auf die auf die unbehandelten Ohren 10 Sekunden gepresst.
- 30
- 35

[0078] Nach Bebrütung bei 30°C für 1,5 Stunden wurden die Hautareale der Akzeptor-Ohren auf Müller- Hinton Platten ausgestrichen und bei 37°C inkubiert.

Auswertung:

[0079] Die Auswertung und statistische Sicherung erfolgte wie im Beispiel 9 beschrieben.

Ergebnisse:

[0080] Die Testung der Mikro- und Nanopartikeln, hergestellt nach Beispiel 1 und 2, zeigte auch im Donator-Akzeptor-Versuch, mit dem die Infektionsübertragung mittels Hautkontakt simuliert wurde , eine signifikante Reduktion der übertragenen Keime.

[0081] Die Zahl der Wiederholungen am Mäuseohr betrug für die unbehandelten Kontrollen 163, dabei wurde auf Hautarealen Keimwachstum nachgewiesen. Bei Vorbehandlung mit der Zubereitung nach Beispiel 1 und 2 wurden 12 Hautareale mit und 5 ohne Keimnachweis. Daraus ergibt sich, das nach einer entsprechenden Vorbehandlung im Mittel nur noch 1,2 Keime/cm<sup>2</sup> zu erwarten sind (Figur 2).

**Beispiel 12 Testung von Mikro- und Nanopartikeln „Biomasse B30/Vitamin C“ hergestellt nach Beispiel 1 und 2 am Hängebauchschwein**

Methodik:

[0082] Für die Testung stand ein Hängebauchschwein zur Verfügung. 2 Stunden nach Tötung des Tieres wurde von der Bauchunterseiten, in Nähe der Zitzen Haut herausgeschnitten, die Fettschicht weitestgehend entfernt und in Stücke geschnitten. Diese wurde auf Vorrichtungen gespannt, so dass ca. 1cm<sup>2</sup> zur Bearbeitung zur Verfügung stand. Diese Hautflächen wurden rasiert bzw. die Borsten mit der Schere abgeschnitten und anschließend 2 x mit 70% Ethanol abgerieben. 20 µl Testsubstanz wurden aufgebracht und 45 min inkubiert. Die Kontamination erfolgte mit 10 µl des Norddeutschen Stammes, MF 0,5 1:10 verdünnt. Nach Bebrütung bei 30°C für 1,5 Stunden wurden die Hautareale auf Müller Hinton Platten ausgestrichen und bei 37°C inkubiert. Nach der Bebrütung erfolgte die Auszählung der Keime..

Ergebnis

[0083] Trotz der vorgenommenen Hautdesinfektion waren auf dem Abstrich zahlreiche koagulasenegative apathogene Staphylokokken der normalen Hautflora des Schweins nachweisbar. Die koagulase positiven Staphylococcus aureus-Stämme, mit denen die Kontamination vorgenommen worden war, waren bei der unbehandelten Kontrolle zahlreich neben S. epidermidis nachweisbar, bei der erfindungsgemäß behandelten Tieren waren alle untersuchten Kolonien koagulase negativ.

**Beispiel 13** Testung von Mikro- und Nanopartikeln „Biomasse B30/Vitamin C“ hergestellt nach Beispiel 6 am Hautmodell nach Beispiel 10

Ergebnis

- 5 [0084] Die Zahl der Wiederholungen an der Kuheuterzitze betrug für die unbehandelten Kontrollen 158. Die Zahl der Hautareale mit Keimnachweis betrug nach Anwendung der Mikro- und Nanopartikel 2 und ohne Keimnachweis 4. Das bedeutet, dass nach Behandlung mit der erfindungsgemäßen Zubereitung nach Beispiel 5 im Mittel nur noch 0,4 Keime/cm<sup>2</sup> zu erwarten sind. Die Keimzahlreduktion ist im Chi-Quadrat-Test hoch signifikant.

10 **Beispiel 14** Testung von Mikro- und Nanopartikeln „Biomasse B30/Vitamin C“ hergestellt nach Beispiel 6 am Hautmodell nach Beispiel 11

Ergebnisse:

- 15 [0085] Die Testung der Mikro- und Nanopartikeln, hergestellt nach Beispiel 6, zeigte im Donator-Akzeptor-Versuch, mit dem die Infektionsübertragung mittels Hautkontakt simuliert wurde, eine signifikante Reduktion der übertragenen Keime. Die Zahl der Hautareale mit Keimnachweis betrug 1 und ohne Keimnachweis 5. Daraus ergibt sich, dass nach der erfindungsgemäßen Vorbehandlung im Mittel nur noch 0,18 Keime beobachtet werden. Die Reduktion der übertragenen Keime ist im Chi-Quadrat-Test hoch signifikant.
- 20

**Beispiel 15:** Prüfung von Mikro- und Nanopartikeln, hergestellt nach den Beispielen am Hautmodell nach Beispiel 10

25 Ergebnisse

[0086] Die Mikro- und Nanopartikeln Norlichexanthon-Vitamin E-Q10 (Lösungsmittelverfahren) wurden nach Beispiel 7, 8, 9 hergestellt und im Verhältnis 1 : 1 : 1 gemischt. Die Testung erfolgte nach dem in Beispiel 10 dargestellten Verfahren.

30 Ergebnis

[0087] Die Anzahl der getesteten Zubereitungen mit der Norlichexanthon betrug 22. Die Zahl der Hautareale mit Keimnachweis betrug 19 und ohne Keimnachweis 3. Im Mittel sind nach Vorbehandlung mit erfindungsgemäßen Zubereitungen nach Beispiel 8 noch 2 Keime zu erwarten.

35 **Beispiel 16** Herstellung von Ubichinon Q1 –Biomasse - Partikeln



Tabelle 10 Rezeptur der Ubichinon – Algenbiomasse - Partikeln

Stoff	Menge in g
Wirkstoff (Ubichinon Q1)	0,05
Biomasse Ocillatoria redikei HUB051	5,00
Emulgator (Plantacare 2000)	0,05
Demineralisiertes Wasser	45,00
Homogenisationszyklen	4

5 [0088] Die Biomasse wird auf eine Temperatur von 50 °C erwärmt und anschließend Ubichinon Q1 darin dispergiert bzw. gelöst. Davon getrennt wird eine wässrige Emulgatorlösung auf die entsprechende Temperatur (50 °C) erwärmt. Danach werden beide Phasen bei der gewünschten Homogenisierungstemperatur vereint. Anschließend wird das Gemisch mit Hilfe eines Ultra Turrax T25 der Fa. Janke und Kunkel GmbH & Co KG (Staufen, Deutschland) in  
10 einem Emulgierungsprozess bei 8000 Umdrehungen pro Minute und einer Dauer von 30 Sekunden verarbeitet.

[0089] Die Suspension wird danach mit einem Kolbenspalt-Hochdruckhomogenisator Micron Lab 40 (APV-Gaulin, Lübeck) bei einem Druck von 500 bar und einer Temperatur von 50 °C vier mal homogenisiert.

15

**Beispiel 17: Verhinderung der Übertragung von MRSA bei Hautkontakten mit der Zubereitung nach Beispiel 15**

**Methodik**

20 [0090] Für die Versuche wurden Schwänze von Mäusen aus keimfreier Haltung verwendet. Um jede Fremdkontamination auszuschließen, wurde sie vor Versuchsbeginn für 5 min in 70 %igen Alkohol eingelegt und danach unter der Laminarbox getrocknet.

25 [0091] Die Donatormäuseschwänze als Infektionsquelle wurden durch Einlegen (30 s bis 4 min) in eine verdünnte MRSA.Kultur (Norddeutscher Stamm, MF-Standard 0,5 bzw. 0,3) kontaminiert und danach 24 h bei 37 °C bebrütet. Bei Abstrichen von diesen Donatoren wurden Keimzahlen > 100.000 nachgewiesen.

[0092] In die Mäuseschwänze, die den empfänglichen Organismus simulieren (Akzeptoren) wurden die Versuchssubstanzen zweimal täglich einmassiert.

- 5 [0093] Die Infektionsübertragung vom Donator zum Akzeptor erfolgte durch Hautkontakt mit den Donatoren für 30 s bis 1 min auf der Schüttelmaschine bei 600 U/min. 2 h bzw. 24 h nach der Kontamination wurden die Donatoren auf Blut-Müller-Hinton-Agarplatten ausgestrichen. Nach 24 h Bebrütung der Agarplatten bei 37 °C wurden die Kolonien ausgezählt.

## 10 Ergebnisse:

Tabelle 12 Keimzahlen auf Mäuseschwänzen (Akzeptoren) in Abhängigkeit von der Vorbehandlung nach Kontakt mit MRSA kolonisierten Mäuseschwänzen (Donatoren).

Donator		Hautkontakt (min)	Vorbehandlung des Akzeptors	Keimzahl des Akzeptors	
McFarland- Standard	Kontamination (min)			2 h	24 h
0,5	5	0,5 1	ohne	>10000 > 10000	>10000 > 10000
0,5	5	0,5 1	2 d Zubereitung nach Beispiel 15	143	2
				80	36
0,5	3	0,5	ohne	>10000	>10000
			2 d Zubereitung nach Beispiel 15		6
0,3	1	1	ohne		> 10000
			2 d Zubereitung nach Beispiel 15		2

15 [0094] Beim Ausstreichen der Akzeptoren unmittelbar nach dem Hautkontakt sind die Platten vollständig bewachsen (Keimzahl > 10 000). Das gilt gleicherweise für vorbehandelte wie für Kontrollen ohne Vorbehandlung. Das bedeutet, dass eine massive Übertragung der MRSA in diesem Modell gut simuliert werden kann. Bei Versuchs- und Kontrollgruppe wird die gleiche

20 Keimzahl übertragen.

[0095] 2 h bzw. 24 h sind dagegen nur noch geringen Keimzahlen bei den vorbehandelten Akzeptoren nachzuweisen, während die Keimzahlen bei den unbehandelten Kontrollen unverändert hoch sind. (Tab. 12). Auch mit diesem Versuchsmodell kann also die Unterbrechung der Infektionswege durch eine Vorbehandlung mit den erfindungsgemäßen Formulierungen nachgewiesen werden.

**Beispiel 18:** Teilchengrößenbestimmung der Mikro- und Nanopartikeln, hergestellt nach Beispiel 3

**Methodik**

[0096] Die Teilchengröße durch Photonenkorrelationsspektroskopie wurde mit Hilfe eines Malvernizer III (Malvern, UK) bestimmt.

**Beispiel 19:** Herstellung von Mikro- und Nanopartikeln mit DNA aus Biomasse von Cyanobakterien der Ordnung Chroococcales.

Tabelle 13: Rezepturbeispiele Einarbeitung der DNA in Algenbiomasse

Stoff	Rezeptur 1	Rezeptur 2	Rezeptur 3
Wirkstoff (Heringsspermien-DNA)	5 %	10 %	15 %
Algenbiomassegrundlage der Ordnung Chroococcales	5,00 g Cyanobakterien		
Emulgator	0,60 g Plantacare®	1,25 g Pluronic®F-68	0,60 g Miranol Ultra 32
Demineralisiertes Wasser	45,00 g		
Homogenisationszyklen	4	3	3

[0097] Bei der Inkorporation der DNA (Sigma-Aldrich, Deisenhofen (Deutschland)) in Algenbiomasse-Partikeln werden die Herstellungsparameter leicht variiert, um einer Zerstörung der DNS entgegenzuwirken:

- Vorhomogenisation mit dem Ultra-Turrax: 30 sec
- Homogenisationstemperatur: 55°C
- Homogenisationsdruck: 500 bar
- Zahl der Homogenisationszyklen: 2

[0098] Dabei wird die DNA einmal in getrockneter Form nach Lyophilisation in der Algenbiomasse dispergiert und homogenisiert. Zum anderen wird die in Wasser gelöste DNS einfach zur wässrigen Emulgatorlösung hinzugegeben und mit dieser zusammen in der erwärmten Algenbiomasse verteilt, woran sich dann ebenfalls die Homogenisation anschließt.

**Beispiel 20** Herstellung von Mikro- und Nanopartikeln mit Triamcinolon aus Biomasse von Cyanobakterien der Ordnung Chroococcales

Tabelle 14: (Lösungsmittel-Emulsionsverfahren)

Wasser	45,00 g gereinigtes, filtriertes Wasser
organisches Lösungsmittel	7,50 g Dichlormethan
Algenbiomasse (Spirulina)	1,12 g Cyanobakterien (15 % bezogen auf Dichlormethan)
Triamcinolon	0,12 g Triamcinolon
lipophiler Emulgator	0,38 g Epikuron® 170 (5 % bezogen auf Dichlormethan)
Cotensid	0,11 g Pluronic® F-68 (1,5 % bezogen auf Dichlormethan)

[0099] Die Herstellung der Triamcinolon-Cyanobakterien-Mikropartikeln basiert auf der Bereitung einer Emulsion aus Wasser und einer Lösung der Cyanobakterien mit dem Wirkstoff Triamcinolon in dem Lösungsmittel Dichlormethan. Nach einem Homogenisationsschritt wird das organische Lösungsmittel (Dichlormethan) durch Verdampfen entfernt, wobei die Algenbiomasse in Form von festen Nanopartikeln ausfällt. Die Stabilisierung der Emulsion bzw. Dispersion erfolgt durch ein geeignetes Tensidgemisch (Pluronic® F-68).

[0100] Als Geräte werden ein Ultra- Turrax T25 der Firma Janke & Kunkel GmbH & Co KG (Staufen/ Deutschland), sowie ein Kolben-Spalt-Homogenisator Micron Lab 40 der Firma APV Gaulin (Lübeck Deutschland) mit 7 Zyklen und bei 800 bar eingesetzt. Zusätzlich wird ein Rotationsverdampfer Rotavapor R114 mit einem angeschlossenen Vakuumsystem B178 der Firma Büchi (Flawil/ Schweiz) bei einem Druck von 0,7 bar 60 min lang verwendet.

**Beispiel 21:** Herstellung von Ubichinon Q1 – Algenbiomasse – Partikeln

Tabelle 15: Rezeptur der Ubichinon – Algenbiomasse – Partikel

Stoff	Menge in g
Wirkstoff (Ubichinon Q1)	0,05
Algenbiomasse	5,00

Emulgator (Plantacare 2000)	0,05
Demineralisiertes Wasser	45,00
Homogenisationszyklen	4

[0101] Die Algenbiomasse wird auf eine Temperatur von 50°C erwärmt und anschließend der verwendete Wirkstoff Ubichinon Q1 darin dispergiert bzw. gelöst. Davon getrennt wird eine wässrige Emulgatorlösung auf die entsprechende Temperatur (50°C) erwärmt. Danach werden beide Phasen bei der gewünschten Homogenisierungstemperatur vereint. Anschließend wird das Gemisch mit Hilfe eines Ultra Turrax T25 der Fa. Janke und Kunkel GmbH & Co KG (Staufen, Deutschland) in einem Emulgierungsprozess bei 8000 Umdrehungen pro Minute und einer Dauer von 30 Sekunden verarbeitet. Die Suspension wird danach mit einem Kolbenspalt-Hochdruckhomogenisator Micron Lab 40 (APV-Gaulin, Lübeck) bei einem Druck von 500 bar und einer Temperatur von 50°C vier mal homogenisiert.

**Beispiel 22: Tabelle 16: Rezepturbeispiele Einarbeitung von DNA in Algenbiomasse**

Stoff	Rezeptur 1	Rezeptur 2	Rezeptur 3
Wirkstoff (DNA)	5 %	10 %	15 %
Algenbiomassegrundlage	5,00 g Cyanobakterien		
Emulgator	0,60 g Plantacare®	1,25 g Pluronic®F-68	0,60 g Miranol Ultra 32
Demineralisiertes Wasser	45,00 g		
Homogenisationszyklen	4	3	3

[0102] Bei der Inkorporation der DNS in Algenbiomasse-Partikeln werden die Herstellungsparameter leicht variiert, um einer Zerstörung der DNS entgegenzuwirken:

- Vorhomogenisation mit dem Ultra-Turrax: 30 sec
- Homogenisationstemperatur: 55°C
- Homogenisationsdruck: 500 bar
- Zahl der Homogenisationszyklen: 2

[0103] Dabei wird die DNS einmal in getrockneter Form nach Lyophilisation in der Algenbiomasse dispergiert und homogenisiert. Zum anderen wird die in Wasser gelöste DNS einfach zur wässrigen Emulgatorlösung hinzugegeben und mit dieser zusammen in der erwärmten Algenbiomasse verteilt, woran sich dann ebenfalls die Homogenisation anschließt.

**Beispiel 23: Herstellung von Trimacinolon-Algebiomasse-Mikropartikeln**

Tabelle 17: (Lösungsmittel-Emulsionsverfahren)

Wasser	45,00 g gereinigtes, filtriertes Wasser
organisches Lösungsmittel	7,50 g Dichlormethan
Algenbiomasse	1,12 g Cyanobakterien (15 % bezogen auf Dichlormethan)
Triamcinolon	0,12 g Triamcinolon
lipophiler Emulgator	0,38 g Epikuron® 170 (5 % bezogen auf Dichlormethan)
Cotensid	0,11 g Pluronic® F-68 (1,5 % bezogen auf Dichlormethan)

[0104] Die Herstellung der Trimacinolon-Cyanobakterien-Mikropartikeln basiert auf der Be-  
 5 reitung einer Emulsion aus Wasser und einer Lösung der Cyanobakterien mit dem Wirkstoff  
 Triamcinolon in dem Lösungsmittel Dichlormethan. Nach einem Homogenisationsschritt wird  
 das organische Lösungsmittel (Dichlormethan) durch Verdampfen entfernt, wobei die Algen-  
 biomasse in Form von festen Nanopartikeln ausfällt. Die Stabilisierung der Emulsion bzw.  
 Dispersion erfolgt durch ein geeignetes Tensidgemisch (Pluronic® F-68).

10 [0105] Als Geräte werden ein Ultra- Turrax T25 der Firma Janke & Kunkel GmbH & Co KG  
 (Staufen/ Deutschland), sowie ein Kolben-Spalt-Homogenisator Micron Lab 40 der Firma  
 APV Gaulin (Lübeck Deutschland) mit 7 Zyklen und bei 800 bar eingesetzt. Zusätzlich wird  
 ein Rotationsverdampfer Rotavapor R114 mit einem angeschlossenen Vakuumsystem B178  
 der Finna Büchi (Flawil/ Schweiz) bei einem Druck von 0,7 bar 60 min lang verwendet.

15 **Beispiel 24: Einfluss von Mikro- und Nanopartikeln mit Aggregaten aus lipidhaltigen marinen  
 Organismen und Tonmineralien auf das Wachstum von Amnion-Epithelzellen.**

[0106] Cyanophyceae wurden bis zu 2 Monaten mit Zusätzen von Bentonit, Friedländer Ton  
 20 und Kaolin kultiviert. Bereits nach kurzer Inkubationszeit bilden sich Aggregate, während bei  
 den Kontrollen ohne mineralische Zusätze diese erst nach 2 Monaten und in geringerem Um-  
 fang gebildet werden. Das Mineral mit der höchsten Absorptionsfähigkeit (Bentonit) zeigt  
 eine geringere Tendenz zur Bildung der Aggregate als Kaolin mit einer geringen Absorptions-  
 fähigkeit. Durch die Wahl der mineralischen Komponenten kann die Aggregatbildung und die  
 25 Absorptionsfähigkeit der gebildeten Aggregate gesteuert werden. Die Aggregate wurden an-  
 schließend mit Hilfe eines Ultra Turrax T25 der Fa. Janke und Kunkel GmbH & Co KG  
 (Staufen, Deutschland) in einem Emulgierungsprozess bei 8000 Umdrehungen pro Minute  
 und einer Dauer von 30 Sekunden verarbeitet.

[0107] Bei einer Einwirkung auf FL-Zellen verstärken insbesondere Aggregate mit Bentonit  
 30 das Zellwachstum signifikant ( $p = <0,001$ ). Die Beeinflussung ist deutlich stärker als die

Wachstumsförderung durch Friedländer Ton ( $p = 0,024$ ). Der Einfluss von Kaolin ist dagegen nicht signifikant ( $p = 0,2786$ ).

**Beispiel 25: Ermittlung der antibakteriellen Wirksamkeit im Agardiffusionshemmtest.**

5 Tabelle 18:

Erreger	Trihydroxy-benzaldehyd	Trihydroxy-benzaldehyd 3 %ig in dickflüssigen Paraffin	Trihydroxy-benzaldehyd 10 %ig in dickflüssigen Paraffin
Norddeutscher Stamm		12 mm	14 mm

**Beispiel 26: Dekontamination von mit MRSA besiedelter Haut im Mäuseschwänzchentest**

10 Tabelle 19: Keimzahlen auf Mäuseschwänzen (Akzeptoren) in Abhängigkeit von der Vorbehandlung nach Kontakt mit MRSA kolonisierten Mäuseschwänzen (Donatoren).

Donator		Hautkontakt (min)	Vorbehandlung des Akzeptors	Keimzahl des Akzeptors	
McFarland-Standard	Kontamination (min)			2 h	24 h
0,5	5	0,5 1	ohne	>10000 > 10000	>10000 > 10000
0,5	5	0,5 1	2 d Gemisch	143 80	2 36
0,5	3	0,5	ohne	>10000	>10000
			2 d Gemisch		6
0,3	1	1	ohne		> 10000
					2

**Beispiel 27: Verhinderung der Übertragung von MRSA bei Hautkontakten**

15 Methodik:

[0108] Für die Versuche wurden Schwänze von Mäusen aus keimfreier Haltung verwendet. Um jede Fremdkontamination auszuschließen, wurde sie vor Versuchsbeginn für 5 min in 70 %igen Alkohol eingelegt und danach unter der Laminarbox getrocknet.

[0109] Die Donatormäuseschwänze wurden durch Einlegen (30 s bis 4 min) in eine verdünnte MRSA-Kultur (Norddeutscher Stamm, MF-Standard 0,5 bzw. 0,3) kontaminiert und danach 24 h bei 37 °C bebrütet. Bei Abstrichen von diesen Donatoren wurden Keimzahlen > 100.000 nachgewiesen.

- 5 [0110] In die Akzeptorschwänze wurden die Versuchssubstanzen zweimal täglich einmassiert.  
[0111] Die Kontamination der Akzeptoren erfolgte durch Hautkontakt mit den Donatoren für 30 s bis 1 min auf der Schüttelmaschine bei 600 U/min. 2 h bzw. 24 h nach der Kontamination wurden die Donatoren auf Blut-Müller-Hinton-Agarplatten ausgestrichen. Nach 24 h Bebrütung der Agarplatten bei 37 °C wurden die Kolonien ausgezählt.

10 Ergebnisse:

- [0112] Beim Ausstreichen der Akzeptoren unmittelbar nach dem Hautkontakt sind die Platten vollständig bewachsen (Keimzahl > 10 000). Das gilt gleicherweise für vorbehandelte wie für Kontrollen ohne Vorbehandlung, d.h., die Akzeptoren kontaminiert. 2 h bzw. 24 h sind dagegen nur noch geringen Keimzahlen bei den vorbehandelten Akzeptoren nachzuweisen, während die Keimzahlen bei den unbehandelten Kontrollen unverändert hoch sind.
- 15

### Legende zu den Figuren

- Figur 1: Wirkung von Mikro- und Nanopartikeln aus der marinen Biomassen B30 (hergestellt nach Beispiel 1 und 2) im Vergleich zur synergistischen Kombination von B30 mit Vitamin C.
- 20
- Figur 2: Nachweis der Unterbrechung von Infektketten, simuliert im Donator-Akzeptor-Modell, durch die erfindungsgemäße Zubereitung nach Beispiel 1 und 2
- Figur 3 Testung von Mikro- und Nanopartikeln „Biomasse B30/Vitamin C“ hergestellt durch die erfindungsgemäße Zubereitung nach Beispiel 1, 2, 6 am Hängebauchschwein
- 25
- Figur 4: Wirkung von Mikro- und Nanopartikeln hergestellt nach Beispiel 6
- Figur 5: Nachweis der Unterbrechung von Infektketten, simuliert im Donator-Akzeptor-Modell, durch die erfindungsgemäße Zubereitung nach Beispiel 6
- 30
- Figur 6: Teilchengrößenverteilung Mikro- und Nanopartikeln, hergestellt nach Beispiel 3
- Figur 7: Einfluss von Aggregaten von Grünalgen mit Phyllosilikaten auf das Wachstum von Amnion-Epithelzellen.



**Patentansprüche**

1. Pharmazeutisch oder kosmetisch wirksame Mittel, erhalten durch Umwandlung von Biomassen lipidhaltiger mariner Organismen in Mikro- und Nanopartikel.
- 5 2. Mittel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass sie einen mittleren Durchmesser von 10 nm – 10 µm besitzen.
3. Mittel nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass sie zusätzlich ein oder meh-  
10 rere pharmazeutische oder kosmetische Wirkstoffe enthalten.
4. Mittel nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass sie zusätzlich ein oder mehrere Mineralstoffe und/oder Radikalfänger und/oder Nahrungsergänzungsstoffe und/oder Vitamine, insbesondere Vitamin C enthalten.
- 15 5. Mittel nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass sie zusätzlich ein oder mehrere Tonmineralien (Phyllosilikaten), insbesondere Bentonit mit einem Durchmesser < 2 µm enthalten.
- 20 6. Mittel nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass sie als Wirkstoffe
  - a) Xanthon oder deren Derivate und/oder
  - b) Ubichinone der Kettenlänge n= 1 bis n = 15 und/oder
  - c) anorganische Thiocyanate und/oder
  - d) Hydrothiocyanate organischer Basen und/oder
  - e) Trihydroxybenzaldehyd oder dessen Derivate
  - f) DNAenthalten.
7. Mittel nach Anspruch 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass sie Norlichhexanthon enthal-  
25 ten.
8. Mittel nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass sie zusätzlich ein oder mehrere einen oder mehrere dispersionsstabilisierende Substanzen enthalten.

9. Mittel nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass als lipidhaltige marine Organismen

- a) Cyanobakterien der Klasse Oscillatoriales insbesondere die Stämme SPH 03, SPH 04, SPH 05, SPH 06, SPH 09, SPH 10, SPH 11, SPH 12, SPH 13, SPH 14, SPH 20, SPH 21, SPH 22, SPH 23, SPH 25, SPH 26, SPH 29, SPH 32, SPH 34, SPH 37 und/oder
- b) der Klasse Nostocales, insbesondere die Stämme SPH 18, SPH 20, SPH 27, SPH 28, SPH 38 und/oder
- c) der Klasse Chroococcales, insbesondere die Stämme SPH 07a, SPH 07b, SPH 08, SPH 14, SPH 16, SPH 17, SPH 24, SPH 33, SPH 36, SPH 39, SPH 40, SPH 43 und/oder
- d) Klasse Stigonematales und/oder
- e) Makroalgen der Gattungen Asparagopsis, Cystoseira, Codium, Dictyota, Dictyopteris, Enteromorpha, Fucus, Gelidium, Gracilaria, Gracilariopsis, Halopteris, Hypoglossum, Laurencia, Plocamium, Polyneura, Sargassum, Solieria, Ulva und/oder
- f) Thraustochytriden der Gattungen Schizochytrium und Thraustochytrium und/oder
- g) marine Bakterien der Gattungen Photobacterium, Shewanella und Colwellia eingesetzt werden.

5

10. Mittel nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass als lipidhaltige marine Organismen kultivierte lipidhaltige marine Organismen, insbesondere in Gegenwart von Tonmineralien kultivierte lipidhaltige marine Organismen eingesetzt werden.

- 10 11. Verfahren zur Herstellung von pharmazeutisch oder kosmetisch wirksamen Mitteln gemäß den Ansprüchen 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass Biomassen lipidhaltiger mariner Organismen durch Homogenisierung oder Emulsionsbildung in Mikro- und Nanopartikel mit einem Durchmesser von 10 nm -10 µm umgewandelt werden.

- 15 12. Verfahren nach Anspruch 11, gekennzeichnet durch folgende Schritte:

- Erwärmen der marinen Mikroorganismen bis zur Verflüssigung der darin enthaltenen Fettsäuren
- ggf. Zusetzen eines oder mehrerer Wirkstoffe oder Zusätze
- Versetzen der Biomasse oder der beladenen Biomasse mit einem auf oberhalb der Schmelztemperatur der Fettsäuren erwärmten Tensid-Wasser-Gemisch und Vereinigung der beiden Phasen

- Herstellen einer Vorsuspension
- Hochdruckhomogenisierung in einem oder mehreren Homogenisationszyklen

13. Verfahren nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass das Erwärmen der Mikroorganismen und des Tensid-Wasser-Gemischs entfällt und die Wirkstoffe bei Raumtemperatur an den lipidhaltigen marinen Mikroorganismen adsorbiert oder bei Zusatz einer geringen Wassermenge dispergiert werden.

14. Verfahren nach Anspruch 11, gekennzeichnet durch folgende Schritte:

- Suspendieren der marinen Mikroorganismen und ggf. der Zusätze in einem organischen Lösungsmittel und Vordispergieren dieses Gemischs
- Hochdruckhomogenisierung und anschließende Sprüh- oder Gefriertrocknung
- Redispergierung in einer wässrigen Tensidlösung
- erneute Dispergierung und Hochdruckhomogenisierung in einem oder mehreren Homogenisationszyklen

15. Verfahren nach Anspruch 11, gekennzeichnet durch folgende Schritte:

- Emulsionsbildung aus Wasser und Biomasse sowie ggf. mit den Zusätzen
- Lösen der Emulsion in einem geeigneten organischen Lösungsmittel
- Hinzufügen eines wasserlöslichen Co-Tensids und Vordispergierung
- Hochdruckhomogenisierung und Entfernung des Lösungsmittels

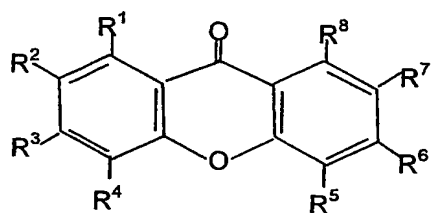
16. Verwendung von Biomassen lipidhaltiger mariner Organismen als Wirkstoffträger.

17. Verwendung von Biomassen lipidhaltiger mariner Organismen in Form von Mikro- und Nanopartikeln gemäß den Ansprüchen 1 bis 10 als pharmazeutisch oder kosmetisch wirksame Mittel.

18. Verwendung von Biomassen lipidhaltiger mariner Organismen in Form von Mikro- und Nanopartikeln gemäß den Ansprüchen 1 bis 10 als Nahrungsmittelzusätze.

19. Verwendung von Biomassen lipidhaltiger mariner Organismen in Form von Mikro- und Nanopartikeln gemäß den Ansprüchen 1 bis 10 zur Herstellung von Kosmetika oder Arzneimitteln oder Nahrungsmitteln.

20. Verwendung nach Anspruch 17 bis 19 in Kombination mit anderen Kosmetika oder Arzneimitteln.
- 5 21. Verwendung nach Anspruch 17 bis 19 zum Gentransfer.
22. Verwendung von Biomassen lipidhaltiger mariner Organismen in Form von Mikro- und Nanopartikeln nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 10 zur Verhinderung der Bindung von nosokomial bedeutsamen Anflugkeimen an Rezeptoren auf der Haut oder Geweben  
10 und/oder ihres Wachstums auf der Haut oder Geweben.
23. Verwendung nach Anspruch 22 zur Verbesserung der natürlichen Barrierefunktion der Haut und/oder zur Veränderungen des Hautmilieus.
- 15 24. Verwendung von Biomassen lipidhaltiger mariner Organismen in Form von Mikro- und Nanopartikeln nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 10 zur Prophylaxe nosokomialer Infektionen.
25. Verwendung nach Anspruch 22 bis 24 zur Hemmung von multiresistenten Staphylococcus aureus- Stämmen, insbesondere methicillinresistenten Stämmen von S. aureus (MRSA).  
20
26. Verwendung nach Anspruch 22 bis 24 zur Sanierung von mit MRSA kontaminierter Haut.
- 25 27. Verwendung nach Anspruch 22 bis 24 zur Pflege der Haut nach einer Dekolonisation mit bakteriziden Mitteln.
28. Verwendung nach Anspruch 22 bis 25 in Kombination mit Xanthonderivaten der Formel



30 , wobei R1-R8 die in Tabelle 1 aufgeführten Substituenten sein können.

29. Verwendung nach Anspruch 22 bis 25 in Kombination mit Vitaminen, insbesondere mit Vitamin C.

30. Verwendung nach Anspruch 16 bis 19 als Antibiotikaträger.

5

31. Verwendung nach Anspruch 17 bis 19 zur dosierten Freisetzung antimikrobieller Wirkstoffe und gleichzeitiger Immunstimulation.

10 32. Verwendung nach Anspruch 17 bis 19 in Slow-release-Systemen zur Prävention Implantat-assoziiierter Infektionen.

33. Verwendung nach Anspruch 17 bis 19 zur Stimulation von Leukozyten oder zur Aktivierung des retikuloendothelialen Systems.

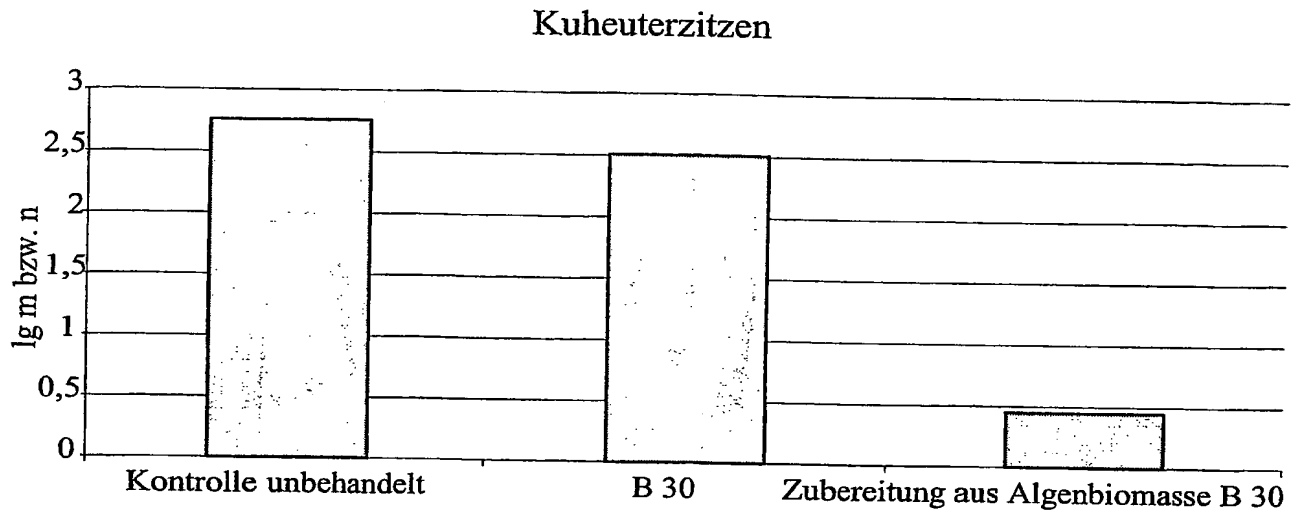
15 34. Verwendung nach Anspruch 17 bis 19 zur Imprägnierung von textilen und/oder auf Zellosebasis hergestellten Materialien oder als Abdeckmaterialien zur Wundversorgung.

35. Verwendung nach Anspruch 17 bis 19 in Form von Ölen, Sprays und/Salben.

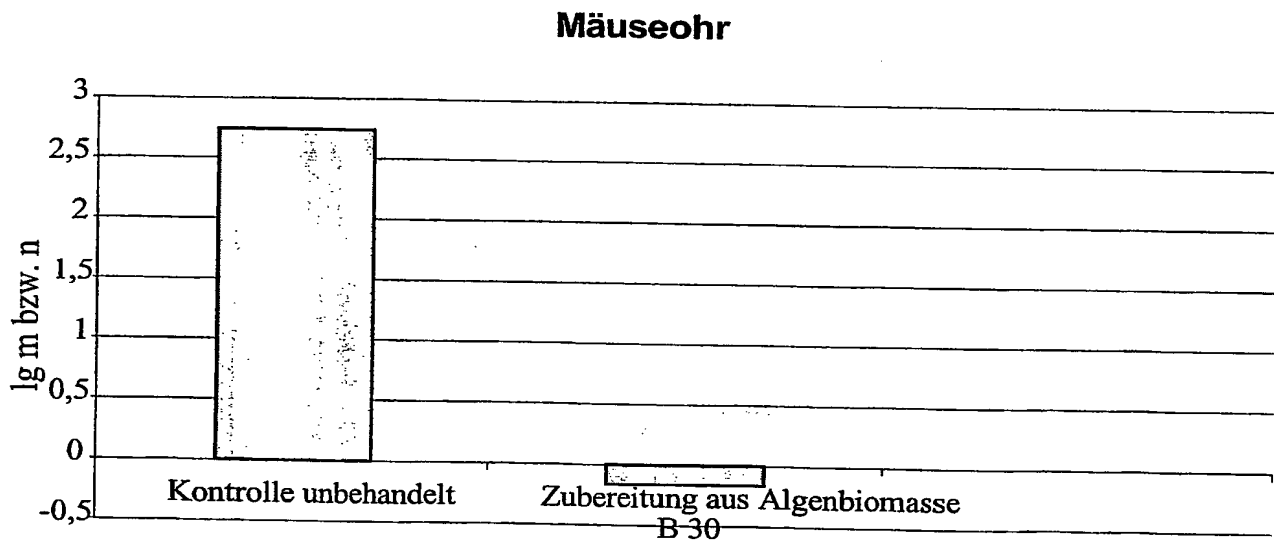
20 36. Verwendung nach Anspruch 17 bis 19 zur Beschleunigung des Zellwachstums.

37. Verwendung nach Anspruch 17 bis 19 zur gezielten Substituierung von Mangelzuständen.

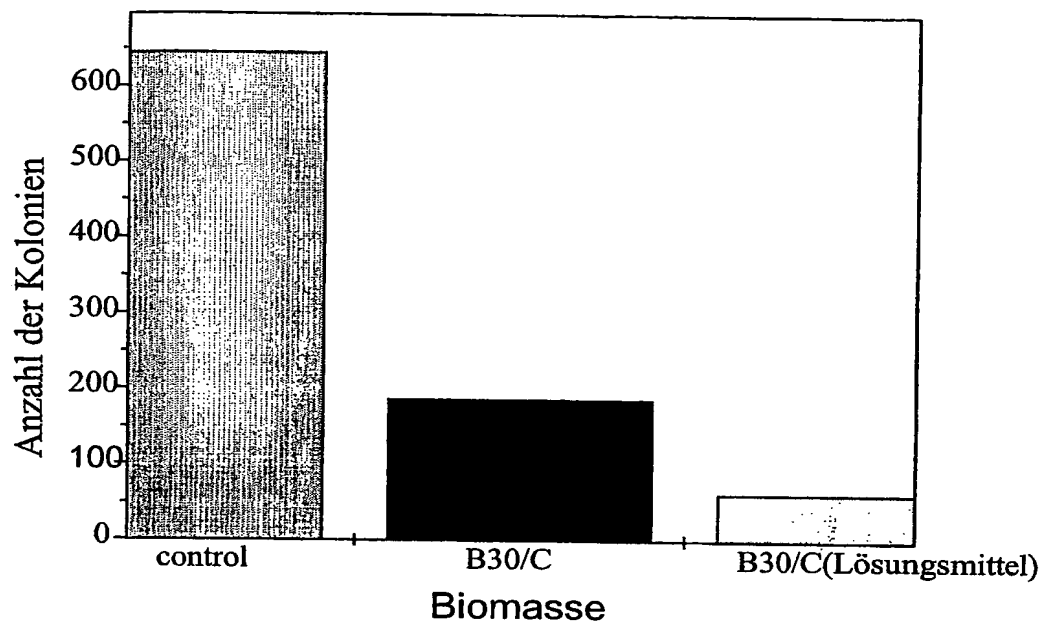
Figur 1



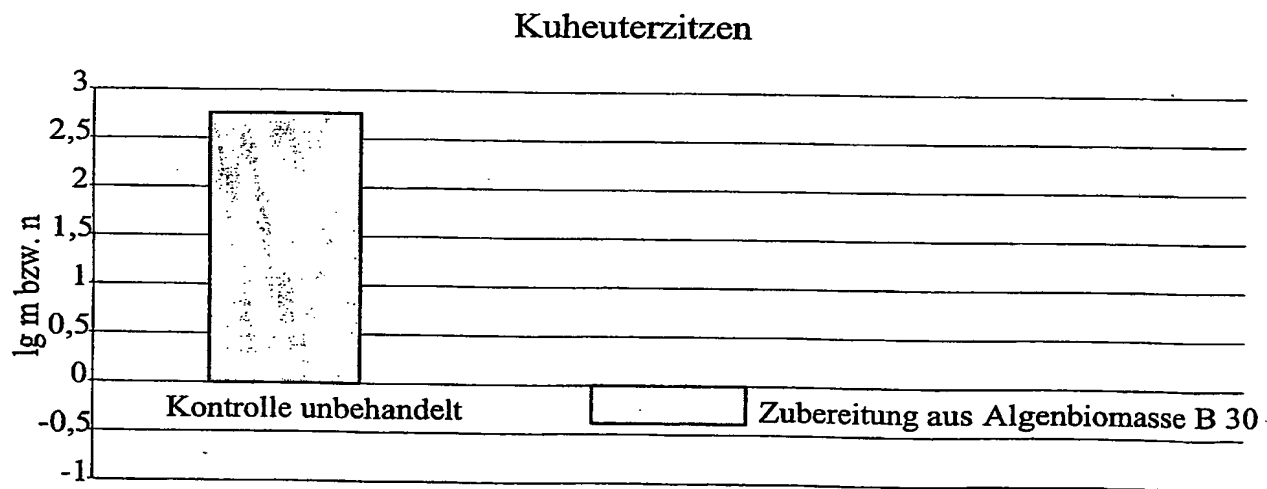
Figur 2



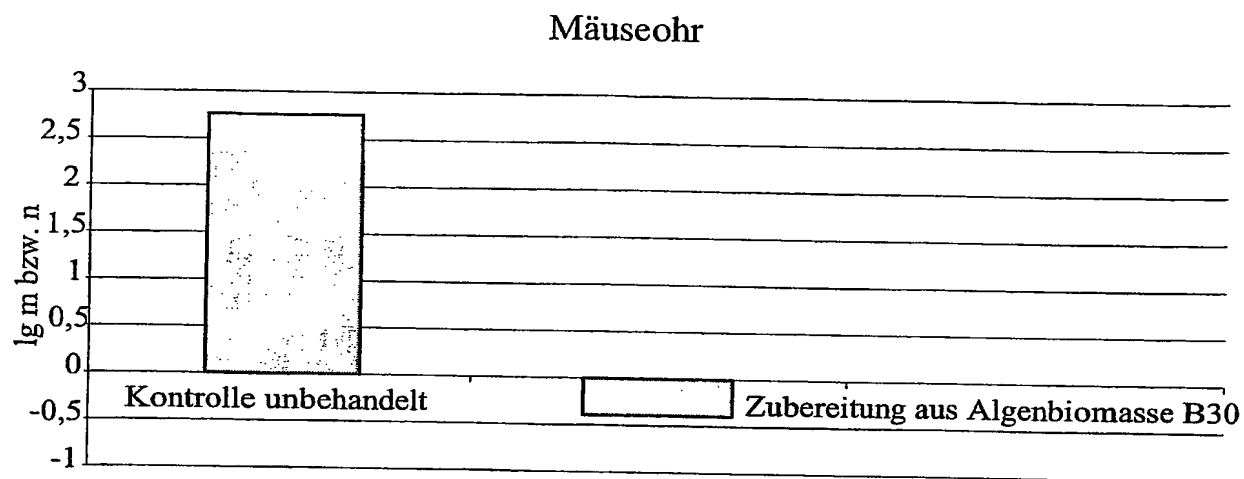
Figur 3



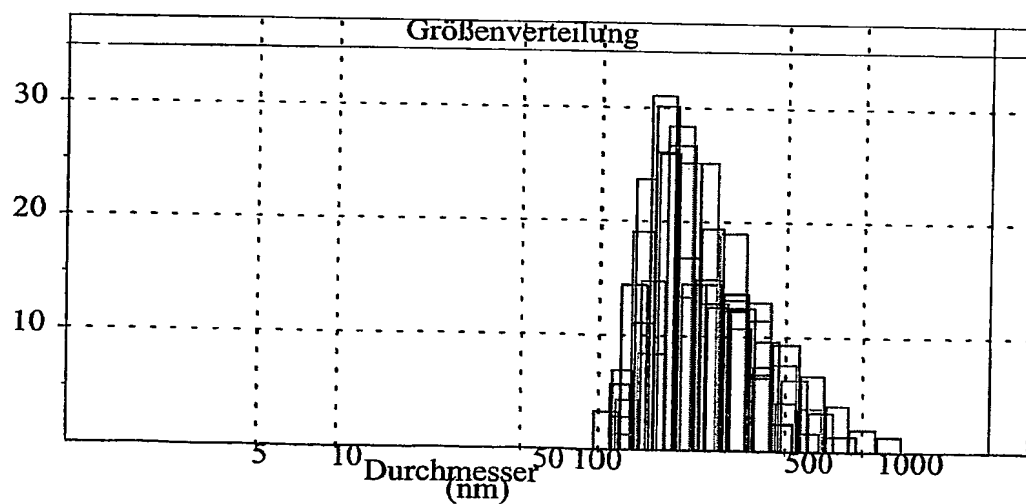
Figur 4



Figur 5



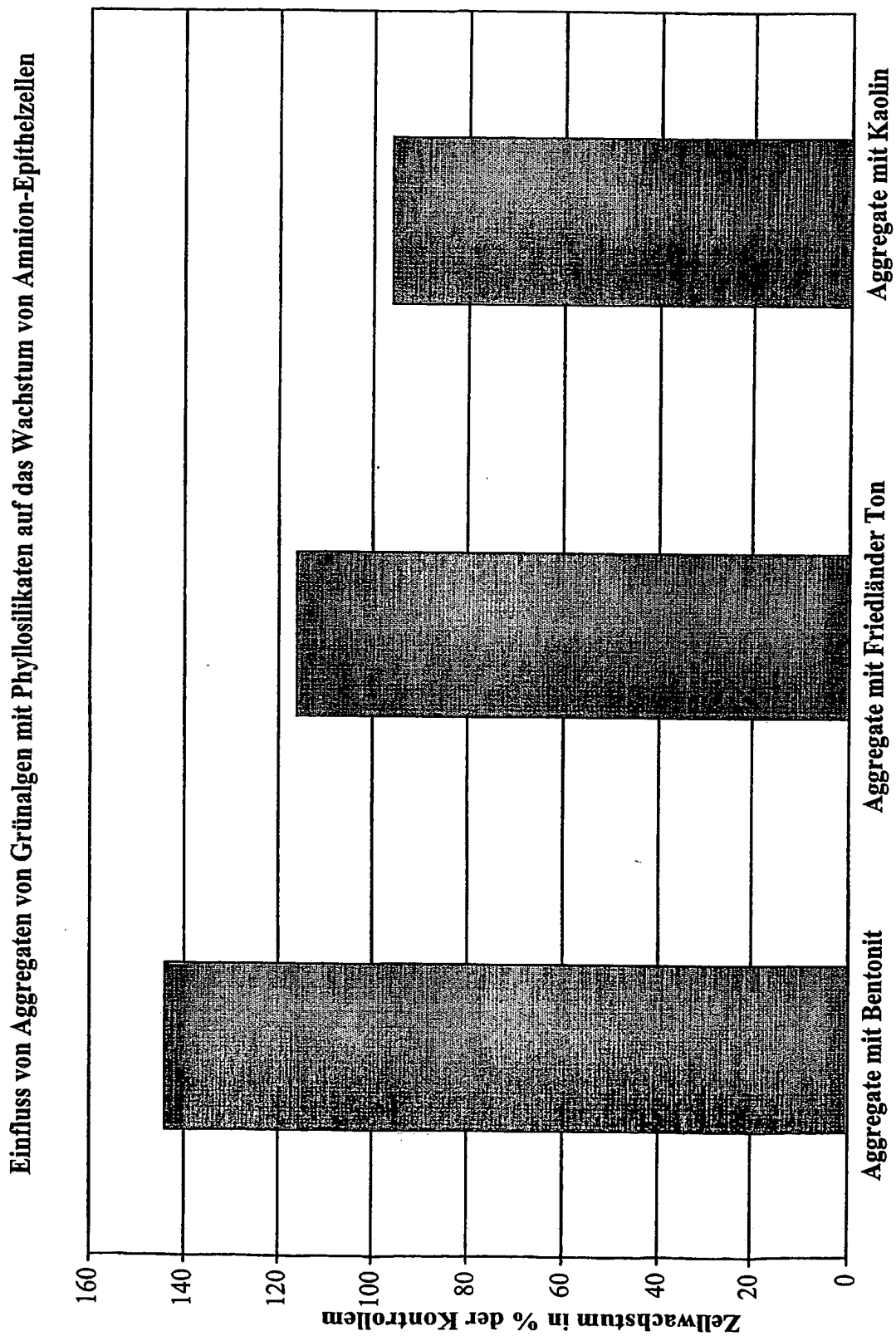
Figur 6





Figur 7

4/4



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internat application No

PCT/DE 03/00747

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 A61K35/70 A61K35/74 A61K35/80 A61K9/16 A61K9/51

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, EMBASE

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>WO 01 64046 A (SCHATTON WOLFGANG ;KREUTER JOERG (DE); SCHATTON MARIA (DE); MUELLE) 7 September 2001 (2001-09-07)</p> <p>page 1, line 9 - line 25 page 2, line 25 -page 3, line 12 page 8, line 20 - line 26 examples 1,3,5,10 claims 1-3,9-13,16,19</p> <p style="text-align: center;">--- -/-</p>	<p>1-4,6,8, 10,11, 16-21, 30-32, 34-37</p>

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents:

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- \* & \* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

22 July 2003

Date of mailing of the international search report

04/08/2003

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Hars, J

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internal

Application No

PCT/DE 03/00747

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 0 629 397 A (PAYOT N G LAB) 21 December 1994 (1994-12-21)  page 2, line 36 - line 56 page 3, line 55 - line 56 page 4, line 4 - line 21 page 5, line 13 - line 15 table 6 claims 1,9-11 ---	1-4, 8-10,16, 17,19, 20,36,37
P,X	DATABASE WPI Section Ch, Week 200325 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B04, AN 2003-248865 XP002248396 & CN 1 362 165 A (YANG M), 7 August 2002 (2002-08-07) abstract ---	1,2,4,8, 17,19
P,X	DATABASE WPI Section Ch, Week 200316 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B04, AN 2003-157857 XP002248397 & CN 1 368 100 A (YANG M), 11 September 2002 (2002-09-11) abstract ---	1,3,4,8, 17,19,20
P,X	DATABASE WPI Section Ch, Week 200281 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B04, AN 2002-741820 XP002248398 & CN 1 360 932 A (YANG M), 31 July 2002 (2002-07-31) abstract -----	1-4,8, 17,19,20

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/DE 03/00747

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 17, 20-33, 36, 37  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

**See the supplemental sheet ISA/210**

2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

### Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Continuation of Box I, 1

Although Claims 17, 20 to 33, 36 and 37 relate to a method for treatment of the human or animal body, the search was carried out on the basis of the alleged effects of the compound or composition.

---

Continuation of Box I, 1

Claims 17, 20-33, 36, 37

PCT Rule 39.1(iv) – Method for the treatment of the human or animal body by therapy.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Internati

Application No

PCT/DE 03/00747

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0164046	A	07-09-2001	DE 10010113 A1	13-09-2001
			AU 3741701 A	12-09-2001
			WO 0164046 A2	07-09-2001
			EP 1259120 A2	27-11-2002
			US 2003032601 A1	13-02-2003
EP 0629397	A	21-12-1994	FR 2706305 A1	23-12-1994
			AT 168555 T	15-08-1998
			DE 69411812 D1	27-08-1998
			DE 69411812 T2	28-01-1999
			EP 0629397 A1	21-12-1994
			ES 2120585 T3	01-11-1998
			GR 3027749 T3	30-11-1998
			JP 7145067 A	06-06-1995
CN 1362165	A	07-08-2002	NONE	
CN 1368100	A	11-09-2002	NONE	
CN 1360932	A	31-07-2002	NONE	

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internal Aktenzeichen

PCT/DE 03/00747

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES  
IPK 7 A61K35/70 A61K35/74 A61K35/80 A61K9/16 A61K9/31

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, EMBASE

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 01 64046 A (SCHATTON WOLFGANG ; KREUTER JOERG (DE); SCHATTON MARIA (DE); MUELLE) 7. September 2001 (2001-09-07)  Seite 1, Zeile 9 - Zeile 25 Seite 2, Zeile 25 - Seite 3, Zeile 12 Seite 8, Zeile 20 - Zeile 26 Beispiele 1,3,5,10 Ansprüche 1-3,9-13,16,19  ----- -/-	1-4,6,8, 10,11, 16-21, 30-32, 34-37

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen☒ Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

\*A\* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

\*E\* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

\*L\* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

\*O\* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

\*P\* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

\*T\* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

\*X\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

\*Y\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

\*Z\* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

22. Juli 2003

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

04/08/2003

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Hars, J

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	EP 0 629 397 A (PAYOT N G LAB) 21. Dezember 1994 (1994-12-21)  Seite 2, Zeile 36 - Zeile 56 Seite 3, Zeile 55 - Zeile 56 Seite 4, Zeile 4 - Zeile 21 Seite 5, Zeile 13 - Zeile 15 Tabelle 6 Ansprüche 1,9-11 ---	1-4, 8-10,16, 17,19, 20,36,37
P,X	DATABASE WPI Section Ch, Week 200325 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B04, AN 2003-248865 XP002248396 & CN 1 362 165 A (YANG M), 7. August 2002 (2002-08-07) Zusammenfassung ---	1,2,4,8, 17,19
P,X	DATABASE WPI Section Ch, Week 200316 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B04, AN 2003-157857 XP002248397 & CN 1 368 100 A (YANG M), 11. September 2002 (2002-09-11) Zusammenfassung ---	1,3,4,8, 17,19,20
P,X	DATABASE WPI Section Ch, Week 200281 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B04, AN 2002-741820 XP002248398 & CN 1 360 932 A (YANG M), 31. Juli 2002 (2002-07-31) Zusammenfassung -----	1-4,8, 17,19,20



**Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)**

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☒ Ansprüche Nr. 17, 20-33, 36, 37  
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich  
siehe Zusatzblatt WEITERE ANGABEN PCT/ISA/210
2. ☐ Ansprüche Nr.  
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3. ☐ Ansprüche Nr.  
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

**Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)**

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese Internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser Internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser Internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der Internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

**Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs**

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- ☐ Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

## WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Fortsetzung von Feld I.1

Obwohl die Ansprüche 17,20-33,36,37 sich auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen Körpers beziehen, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.

---

Fortsetzung von Feld I.1

Ansprüche Nr.: 17,20-33,36,37

Regel 39.1(iv) PCT – Verfahren zur therapeutischen Behandlung des menschlichen oder tierischen Körpers

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

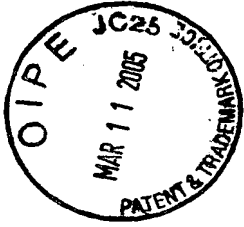
Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internatio

Aktenzeichen

PCT/DE 03/00747

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 0164046	A	07-09-2001	DE 10010113 A1 13-09-2001
		AU 3741701 A	12-09-2001
		WO 0164046 A2	07-09-2001
		EP 1259120 A2	27-11-2002
		US 2003032601 A1	13-02-2003
EP 0629397	A	21-12-1994	FR 2706305 A1 23-12-1994
		AT 168555 T	15-08-1998
		DE 69411812 D1	27-08-1998
		DE 69411812 T2	28-01-1999
		EP 0629397 A1	21-12-1994
		ES 2120585 T3	01-11-1998
		GR 3027749 T3	30-11-1998
		JP 7145067 A	06-06-1995
CN 1362165	A	07-08-2002	KEINE
CN 1368100	A	11-09-2002	KEINE
CN 1360932	A	31-07-2002	KEINE



**THIS PAGE BLANK (USPTO)**